



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
BARCELONATECH  
Escola d'Enginyeria de Barcelona Est

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Grado en Ingeniería Biomédica**

**CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS  
MEDIANTE RECUBRIMIENTOS MULTICAPA SOBRE TITANIO**



**Memoria y Apéndices**

<b>Autor:</b>	Clàudia Pijoan Aniorte
<b>Director:</b>	Daniel Rodríguez Rius
<b>Convocatòria:</b>	Junio 2017





## Resumen

---

Las superficies de los implantes son un foco para la colonización de bacterias, ya sean externas, o se encuentren dentro del organismo. El problema reside en que pueden provocar infecciones severas, con consecuencias devastadoras para el organismo. La dificultad reside en que los implantes son zonas muy poco vascularizadas y tanto los antibióticos, como los antígenos del sistema inmune tienen muy difícil el acceso.

Por ello se está estudiando que el propio implante ya lleve consigo propiedades antibacterianas. En concreto, en este proyecto se estudia que implantes de titanio puedan ir recubiertos de un film polimérico con algún principio activo incrustado, que provoque la inhibición de proliferación bacteriana sobre la superficie del implante.

Este proyecto contempla la posibilidad de que creando multicapas se pueda ralentizar el proceso de difusión y por tanto, alargar el efecto antibacteriano. Como principios activos empleados para el estudio se ha seleccionado el Carvacrol, un aceite esencial con propiedades antibacterianas y la Doxiciclina, un antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas. De esta forma se estudia como varia el proceso de difusión y la caracterización de las superficies de las diferentes muestras dependiendo de las moléculas empleadas.

## Resum

---

Les superfícies dels implants són un focus per a la colonització de bacteris, ja siguin externs, o es trobin dins l'organisme. El problema resideix en que poden provocar infeccions severes, amb conseqüències devastadores per a l'organisme. La dificultat és que els implants són zones molt poc vascularitzades i tant els antibiòtics com els antígens del sistema immune tenen molt difícil l'accés.

Per això s'està estudiant que el mateix implant ja porti en sí mateix propietats antibacterianes. En concret, en aquest projecte s'estudia que implants de titani puguin anar recoberts d'un film polimèric amb algun principi actiu incrustat, que provoqui la inhibició de proliferació bacteriana sobre la superfície de l'implant.

Aquest projecte contempla la possibilitat que creant multi-capes es pugui alentir el procés de difusió i per tant, allargar l'efecte antibacterià. Com a principis actius emprats per a l'estudi s'ha seleccionat el Carvacrol, un oli essencial amb propietats antibacterianes i la Doxiciclina, un antibiòtic que pertany al grup de les tetraciclins. D'aquesta manera s'estudia com varia el procés de difusió i la caracterització de les superfícies de les diferents mostres depenent de les molècules emprades.

## Abstract

---

The surfaces of the implants are a focus for the colonization of bacteria, whether external or inside the body. The problem is that they can cause severe infections, with devastating consequences for the body. The problem is that implants are very low-vascularized areas and antibiotics and antigens of the immune system have very difficult access.

For this reason, it is being studied that the implant itself already carries with it antibacterial properties. Specifically, this project studies that titanium implants can be coated with a polymeric film with some active substance that causes the inhibition of bacterial proliferation on the surface of the implant.

This project contemplates the possibility that creating multilayers can slow down the diffusion process and, therefore, lengthens the antibacterial effect. Carvacrol, an essential oil with antibacterial properties and Doxycycline, an antibiotic belonging to the tetracycline group, has been selected as active ingredients for the study. In this way we study how the diffusion process and the characterization of the surfaces of the different samples vary depending on the molecules used.

## Agradecimientos

---

A mi tutor, Daniel Rodríguez Rius, por la paciencia que ha tenido conmigo, por su plena disposición para ayudarme, por como me ha guiado durante todo el proyecto, y sobretodo, por permitirme vía libre para tomar mis propias decisiones.

A todos los compañeros del laboratorio de Biomateriales BBT, por el apoyo mostrado, la ayuda y compañerismo. En especial, a Elia Vidal, por ayudarme y guiarme en los ensayos bacterianos y realizar los ensayos de adhesión celular, al soporte de Mar Meus y a la ayuda de Ramon Sabaté.

A mi familia, por el apoyo y comprensión que siempre me dan cuando lo necesito. En especial a mi abuela, Dorina Alfonso, por la gran confianza que siempre me transmite.

A mis amigos, que me han apoyado y dado ánimos para seguir hacia delante.

A toda la gente que me ha ayudado de una forma u otra para la realización de este proyecto.

Gracias.

## Glosario

---

- $\beta$ -GP:  $\beta$ -glicerofosfato
- CS: Quitosano
- CVR: Carvacrol
- DOX: Doxíciclina
- PBS: Tampón fosfato salino
- SEM: Microscopía electrónica de barrido
- Ti: Titanio
- TPP: Tripolifosfato de sodio
- IR: Radiación Infrarroja



# Índex

<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>RESUM</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>IV</b>
<b>GLOSSARIO</b>	<b>V</b>
<b>1. PREFACIO</b>	<b>1</b>
1.1 Origen del proyecto .....	1
1.2 Motivación .....	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
2.1 Objetivos del trabajo.....	4
2.2 Alcance del trabajo .....	4
<b>3. ESTADO DEL ARTE</b>	<b>5</b>
3.1 Titanio .....	5
3.1.1 El Titanio comercialmente puro .....	5
3.1.2 La aleación Ti-6Al-4V .....	6
3.1.3 Propiedades de la superficie.....	7
3.1.4 Biocompatibilidad .....	9
3.1.5 Prótesis ortopédicas.....	9
3.2 Quitosano.....	10
3.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	11
3.2.2 Propiedades Biológicas .....	12
3.2.3 Aplicaciones.....	13
3.3 Doxiciclina .....	15
3.3.1 Estructura química .....	15
3.3.2 Mecanismos de acción.....	16
3.3.3 Aplicaciones clínicas .....	16
3.4 Carvacrol .....	17
3.4.1 Estructura química .....	17
3.4.2 Mecanismos de acción.....	17
3.4.3 Aplicaciones.....	18

<b>4. TÉCNICAS APLICADAS</b>	<b>19</b>
4.1 Espectrofotómetro UV-VIS .....	19
4.1.1 Microplate .....	20
4.2 Interferometría de luz blanca .....	20
4.3 Microscopio electrónico de barrido (SEM) .....	21
4.4 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR/ATR) .....	22
4.5 Dip-Coating .....	23
4.6 Autoclave .....	24
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN</b>	<b>25</b>
5.1 Condiciones de estudio .....	25
5.2 Preparación de las muestras .....	26
5.2.1 Embutidora .....	26
5.2.2 Pulidora .....	27
5.2.3 Extracción y limpieza de muestras .....	28
5.3 Recubrimiento del titanio .....	28
5.3.1 Solución de quitosano .....	28
5.3.2 Quitosano cargado con Doxiciclina .....	29
5.3.3 Quitosano cargado con Carvacrol .....	29
5.3.4 Dip-Coating .....	29
5.3.5 Estabilización del quitosano y proceso multicapas .....	30
5.4 Ensayo de liberación de los principios activos .....	31
5.4.1 Microplate .....	31
5.4.2 Liberación de la doxicilina .....	32
5.4.3 Liberación del carvacrol .....	33
5.5 Caracterización del recubrimiento .....	34
5.5.1 Caracterización del Quitosano, la Doxiciclina y el Carvacrol .....	34
5.5.2 Caracterización del acabado superficial .....	35
5.5.3 Caracterización de la rugosidad y espesor de la superficie .....	35
5.5.4 Determinación de las propiedades mecánicas de la superficie .....	36
5.6 Ensayo de inhibición bacteriana .....	36
5.7 Ensayo de adhesión celular .....	38
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
6.1 Ensayo de liberación de los principios activos .....	40
6.1.1 Liberación de la doxicilina .....	40
6.1.2 Liberación del carvacrol .....	43



6.2	Caracterización del recubrimiento .....	46
6.2.1	Caracterización del Quitosano, la Doxyciclina y el Carvacrol .....	46
6.2.2	Caracterización del acabado superficial .....	47
6.2.3	Caracterización de la rugosidad y espesor de la superficie (inter) .....	50
6.2.4	Determinación de las propiedades mecánicas de la superficie .....	52
6.3	Ensayo de inhibición bacteriana .....	53
6.4	Ensayo de adhesión celular .....	55
<b>7.</b>	<b>ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL .....</b>	<b>57</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
	<b>PRESUPUESTO .....</b>	<b>61</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>65</b>
	<b>APÉNDICE A .....</b>	<b>69</b>
A1.	Estudio en Matlab de la liberación de la Doxyciclina .....	69
A2.	Estudio en Matlab de la liberación del Carvacrol .....	76
	<b>APÉNDICE B .....</b>	<b>83</b>
B.1	Imágenes obtenidas con el SEM .....	83
	<b>APÉNDICE C .....</b>	<b>89</b>
C.1	Análisis estadístico de variancia para el ensayo bacteriológico .....	89



# 1. Prefacio

---

## 1.1 Origen del proyecto

El reemplazo articular con prótesis, la fijación de fracturas con material de osteosíntesis, la reconstrucción de ligamentos y tendones y otros procedimientos que involucran implantes ortopédicos son cada vez más frecuentes en la práctica diaria de la ortopedia y traumatología moderna. Las infecciones asociadas con el uso de implantes ortopédicos siguen siendo la principal complicación asociada con estos dispositivos y un desafío no resuelto. La frecuencia de infección asociada con el implante ortopédico es relativamente baja, estimada en un rango entre 0,5 a 5%; sin embargo, tiene graves consecuencias para el paciente.[1]

Las superficies sobre las que existe un crecimiento bacteriano tienen su relativa importancia como hábitat microbiano, ya que estos adsorben gran cantidad de nutrientes. Las superficies de los implantes son medios óptimos para el desarrollo de biofilms ya que las células bacterianas se encuentran protegidas ante ataques del sistema inmunitario, antibióticos y otros agentes antimicrobianos. Esto es debido a que son regiones inertes y que, por tanto, no están vascularizadas, lo que significa que todos estos agentes no pueden llegar a la zona donde hay crecimiento microbiano.

Los microorganismos crecen incluidos en biofilms, formando una estructura de biopelícula en multicapas. Los biofilms son microcolonias revestidas de células bacterianas adosadas a una superficie mediante polisacáridos adhesivos excretados por las propias células. Los biofilms atrapan nutrientes para el crecimiento de las poblaciones microbianas y ayudan a impedir el desprendimiento de las células que crecen sobre las superficies expuestas a corrientes intersticiales.[2]

El primer reemplazo articular se hizo en 1939 por Smith-Petersen. Fue un reemplazo parcial de la articulación de cadera, en aquel momento, un gran avance en el tratamiento de osteoartritis<sup>1</sup>. Unos años más tarde se observaron complicaciones debidas a la infección articular periprotésica<sup>2</sup>. En esa misma época se demostró experimentalmente que un cuerpo extraño aumenta la virulencia de '*Staphylococcus aureus*' unas 10.000 veces [3]. En la siguiente tabla se muestra un resumen de los microorganismos que pueden causar infecciones, estudiado en 618 pacientes después de reemplazos de cadera y de rodilla:

---

<sup>1</sup> Osteoartritis: Degeneración gradual y dolorosa del cartílago y las articulaciones.[4]

<sup>2</sup> Periprotésica: la estructura alrededor de una prótesis.

Table 4. Microorganisms in periprosthetic joint infection	
Microorganism	
<i>Staphylococcus aureus</i>	32.8% (203/618)
Coagulase-negative staphylococci	26.5% (164/618)
<i>Streptococcus</i> spp.	8.7% (54/618)
<i>Enterococcus</i> spp.	6.6% (41/618)
<i>Propionibacterium</i> spp.	1.9% (12/618)
Gram-negative bacilli	6.5% (40/618)
Miscellaneous	1.8% (11/618)
Polymicrobial	6.1% (38/618)
No growth	8.9% (55/618)

Tabla 1. Tabla con los microorganismos más frecuentes en infecciones [3]

De forma general existe una clasificación según cuando se manifieste la infección una vez implantada la prótesis, infecciones tempranas (<3 meses), retrasadas (3-24 meses) y tardías (> 2 años después de la implantación)[3]. Este proyecto se centrará en infecciones tempranas, intentando frenar la aparición de dichas infecciones en implantes de larga duración pero no permanentes.

## 1.2 Motivación

Durante las ultimas décadas se han hecho todas las mejoras a técnicas asépticas, control de la esterilidad del ambiente o profilaxis antibiótica<sup>3</sup>; ahora, para seguir mejorando en la prevención de infecciones relacionadas con implantes médicos, se está desarrollando una nueva estrategia gracias a biomateriales bacteriostáticos. Estos biomateriales no se utilizan solo para dar propiedades bioactivas a los dispositivos a los que pertenecen; además, pueden utilizarse para el suministro de principios activos, tales como medicamentos o antibióticos específicos. En la siguiente imagen se pretende mostrar un esquema de los diferentes métodos posibles para prevenir la formación de biofilms sobre la superficie de dispositivos médicos.

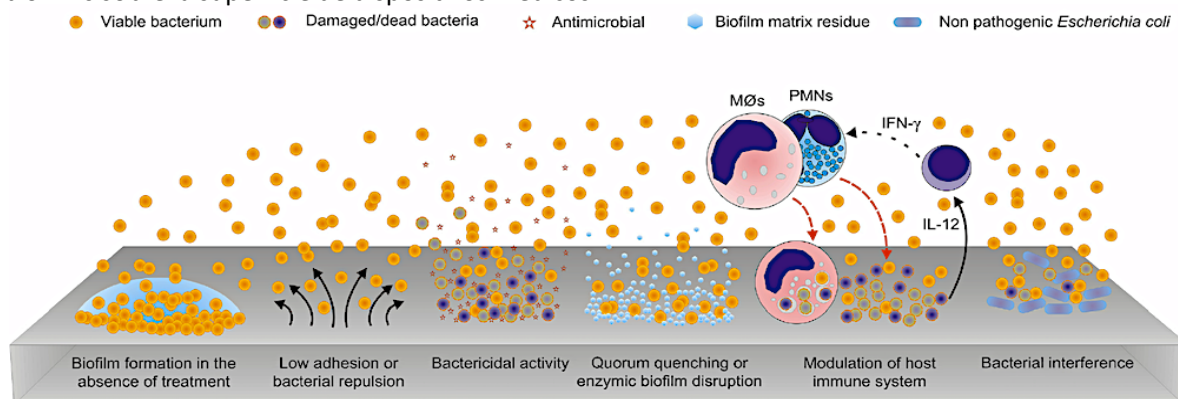


Imagen 1. Gráfico con los diferentes métodos para actuar en contra de la formación de biofilms

<sup>3</sup> Profilaxis antibiótica: Administración intravenosa, inmediatamente antes de una intervención, de una dosis de antibiótico, en prevención de las infecciones de la herida y del lecho quirúrgico, que se producen con mayor o menor incidencia según el tipo de intervención de que se trate. [5]

Se conocen diferentes sustancias que poseen propiedades bactericidas, entre todos ellos, algunos materiales poliméricos, como el quitosano. La actividad bactericida rara vez es altamente específica y orientada únicamente hacia células procariotas, se debe tener precaución dado que puede tener un cierto grado de citotoxicidad, que puede afectar potencialmente la viabilidad de las células en los tejidos circundantes. El quitosano es un polímero policatiónico derivado de la quitina con una baja actividad bactericida, habitualmente potenciada a pH bajo. En las últimas décadas, con la intención de exaltar las propiedades antibacterianas, se ha desarrollado una amplia familia de derivados de quitosano.

A banda de las propiedades intrínsecas de dichos materiales, para producir biomateriales con propiedades antimicrobianas es necesaria la incorporación de principios activos dentro de estos. Pueden incorporarse de forma diversa según la compatibilidad química. Por ejemplo pueden mezclarse simplemente a los ingredientes durante la fase de producción; a posteriori, absorbidos en biomateriales permeables o porosos; o unidos covalentemente a recubrimientos poliméricos funcionalizados. Por otro lado, la liberación puede seguir diferentes métodos, dependiendo del material: difusión a la fase acuosa, erosión o degradación de matrices cargadas reabsorbibles o hidrólisis de enlaces covalentes. [6]

## 2. Introducción

---

### 2.1 Objetivos del trabajo

A continuación se detallan los objetivos principales del trabajo, objetivos preestablecidos antes de empezar y que señalizan la meta de este proyecto. Por otro lado, definimos los objetivos específicos, objetivos que se deben alcanzar para poder llegar a desarrollar dicho proyecto y alcanzar los objetivos principales.

#### Objetivos principales

- Estudiar la liberación de los dos compuestos escogidos, Doxiciclina y Carvacrol, y determinar si se puede establecer un método para controlar el proceso de liberación con la ayuda del uso de multicapas como barreras.

#### Objetivos específicos

- Encontrar el mejor método para dopar al Quitosano.
- Potenciar las propiedades antibacterianas del Quitosano cargando el material con principios activos.
- Definir un proceso para el recubrimiento y el posterior secado de las piezas de Titanio.
- Estudiar las propiedades físico-químicas del recubrimiento.
- Estudiar las propiedades mecánicas del recubrimiento.
- Estudiar las propiedades biológicas del recubrimiento.
- Controlar que el acabado de la superficie de Titanio (pulimento) sea el idóneo.
- Controlar los equipos necesarios para trabajar.

### 2.2 Alcance del trabajo

Mediante este Proyecto se pretende presentar un método por el cual se pueda controlar la liberación de principios activos gracias a la utilización de recubrimientos poliméricos multicapa sobre superficies de titanio. Como ejemplos de principios activos se han escogido la Doxiciclina y el Carvacrol. El estudio incluye un análisis de las propiedades mecánicas, físico-químicas y biológicas del recubrimiento.

A lo largo de la memoria, se describirán los diferentes procesos y diversos experimentos que se han realizado en los laboratorios de BBT, en el campus Besós de la UPC, para llegar a cumplir todos los objetivos establecidos. Así como también, se presentarán todos los resultados concluyentes, haciendo un análisis final de todo el estudio.

## 3. Estado del arte

---

Este capítulo está destinado al análisis detallado de los materiales principales empleados para la realización del Trabajo.

### 3.1 Titanio

El titanio y sus aleaciones son poseedores de una excelente combinación de propiedades que los hacen idóneos en ciertos campos de ingeniería. El titanio pertenece al grupo de metales de transición dentro de la tabla periódica, con el número atómico 22, con una masa atómica de 47.867g/mol y con la siguiente configuración electrónica:  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^2 4s^2$ .

Las aleaciones de titanio son altamente resistentes, pueden llegar a alcanzar los 1400 MPa a temperatura ambiente y presentan una elevada temperatura de fusión (1668°C). También son muy dúctiles y fácilmente forjables y mecanizables. Sin embargo, la principal limitación del titanio es que a elevadas temperaturas presenta gran reactividad con otros materiales. Debido a esta característica, se deben desarrollar técnicas de afino<sup>4</sup>, fusión y moldeo para obtener las aleaciones de titanio. A pesar de dicha reactividad, las aleaciones presentan una elevada resistencia a la corrosión, suelen ser invulnerables al ambiente atmosférico, marino y ciertos ambientes industriales. [7]

#### 3.1.1 El Titanio comercialmente puro

Dada la baja densidad del titanio, 4.7g/cm<sup>3</sup>, sus propiedades mecánicas, su capacidad de oseointegración, biocompatibilidad y gran resistencia a la corrosión, hacen que este material sea el biomaterial candidato para aplicaciones en implantes quirúrgicos.

A 882°C, el titanio sufre una transformación alotrópica<sup>5</sup> por la cual pasa de una estructura hexagonal compacta (fase  $\alpha$ ) a una estructura cúbica centrada en el cuerpo (fase  $\beta$ ). El titanio tiene gran facilidad para disolver por sustitución o inserción otros elementos; y dependiendo del número de electrones de enlace del elemento, tenderá a estabilizar alguna de las dos fases alotrópicas. [8]

Existen cuatro grados de titanio sin ningún tipo de aleación para implantes quirúrgicos; estos cuatro grados se diferencian dependiendo del contenido de impurezas (oxígeno, nitrógeno, carbono, hidrógeno y hierro), que son los elementos que controlan sus propiedades mecánicas. En las siguientes tablas se muestran las proporciones de los elementos para componer los

---

<sup>4</sup>Afino: Proceso mediante el cual se eliminan las impurezas que perjudican al empleo industrial de los metales, o se reducen a su forma menos nociva.[4]

<sup>5</sup>Alotropía: Propiedad de algunos elementos químicos, debido a la cual pueden presentarse con estructuras moleculares distintas, como el oxígeno, que existe como oxígeno divalente y como ozono; o con características físicas diversas, como el carbono, que puede aparecer en forma de grafito o de diamante.[4]

diferentes grados del titanio y como varían las propiedades mecánicas en función de cada grado de titanio.

Elemento	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Nitrógeno.máx	0.03	0.03	0.05	0.05
Carbono. máx.	0.10	0.10	0.10	0.10
Hidrógeno.máx	0.0125	0.0125	0.0125	0.0125
Hierro.máx.	0.2	0.30	0.30	0.50
Oxígeno. máx.	0.18	0.25	0.35	0.40
Titanio. máx.	balance	Balance	balance	balance

**Tabla 2.** Tabla de las diferentes composiciones químicas para formar los cuatro grados del titanio. [9]

Propiedades	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Carga de rotura (MPa)	240	345	450	550
Límite elástico (0.2%) (MPa)	170	275	380	485
Elongación (%)	24	20	18	15
Estricción (%)	30	30	30	25

**Tabla 3.** Tabla de propiedades mecánicas del Titanio Puro para implantes. [8]

Otra ventaja del titanio para aplicaciones biomédicas es su módulo de Young, este valor es de 110 GPa. Como el módulo elástico del hueso es de 20 GPa, el titanio es más compatible con tejido vivo que otras aleaciones, como aleaciones de cobalto (220 GPa) o acero inoxidable (200 GPa). Sin embargo, el titanio tiene una pobre resistencia a cizalladura, por lo que no es adecuado para tornillos óseos y clavos. [8]

### 3.1.2 La aleación Ti-6Al-4V

Es la aleación más utilizada para aplicaciones biomédicas, sobretudo para prótesis articulares. Las ventajas de dicha aleación son su gran resistencia a la corrosión, biocompatibilidad y sus buenas propiedades mecánicas; además, con tratamientos térmicos, permite la modificación de sus propiedades. Otra ventaja añadida es que la presencia de Vanadio en la aleación hace que la conformación del material por deformación plástica sea mucho mas fácil. [9]

Por otro lado, no son todo ventajas, es decir, la aleación Ti-6Al-4V tiene una baja resistencia al desgaste, incluso pudiéndose desgastar con tan solo el rozamiento con tejido blando. Por ello, se realizan diferentes procesos de endurecimiento, como por ejemplo nitruraciones (añadir nitrógeno) mediante implantación iónica o difusión de nitrógeno; de esta forma se pueden mejorar las propiedades tribológicas<sup>6</sup> de la aleación. [9]

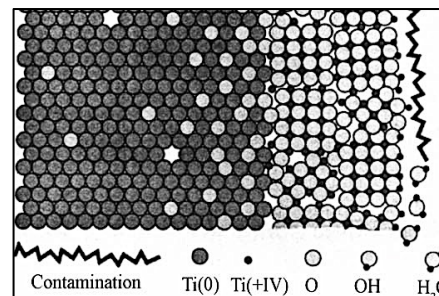
<sup>6</sup>Tribología: Técnica que estudia el rozamiento entre los cuerpos sólidos, con el fin de producir mejor deslizamiento y menor desgaste de ellos. [4]



### 3.1.3 Propiedades de la superficie

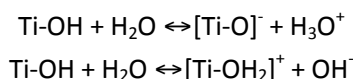
Parte de las buenas cualidades del titanio y sus aleaciones, como la estructura, la composición y sus propiedades, son debidas a la presencia de óxido en la superficie, una película de tan solo unos nanómetros de espesor que se forma tras la exposición al aire y que da una estabilidad química al titanio. Esquemáticamente, las diferentes películas que se forman sobre el titanio se resumen en:[10]

- Una película de óxido amorfo o nanocristalino, de típicamente 3-7nm de espesor, compuesta principalmente por  $\text{TiO}_2$ .
- Una interfase de  $\text{TiO}_2$  / Ti, con una relación de concentración de oxígeno a titanio que varía gradualmente de 2 a 1 en la película de  $\text{TiO}_2$ .
- Se crean enlaces hidróxido con los cationes Ti y se forman uniones débiles con agua sobre la superficie.



**Imagen 2.** Vista esquemática de la capa de óxido sobre titanio [10]

Los iones hidróxido  $\text{OH}^-$  enlazados a cationes metálicos poseen propiedades anfóteras<sup>7</sup>, que variarán según el tipo de cationes metálicos y los enlaces coordinados con los cationes. Las ecuaciones de hidrólisis con las que nos encontramos son las siguientes: [10]



La primera reacción conduce a la formación de cargas negativas sobre la superficie y la segunda reacción, cargas positivas. Por lo que la superficie de óxido de titanio tiene dos grupos hidróxido: ácidos y básicos. Tal y como ya se ha dicho, una de las cualidades que hacen que el titanio sea el escogido para aplicaciones biomédicas es su la estabilidad y resistencia a la corrosión. Esta resistencia es gracias a la capa de dióxido de titanio que protege al metal de la oxidación adicional.

El titanio es idóneo para aplicaciones ortopédicas por su alta resistencia y su bajo módulo elástico. Pero, debido a su baja dureza, es muy poco resistente a abrasiones. Para remediar el problema, existen tratamientos de superficie para mejorar la dureza y la resistencia al desgaste. Hay diferentes procedimientos: incluyendo recubrimientos PVD<sup>8</sup> ( $\text{TiN}$ ,  $\text{TiC}$ ), implante de iones ( $\text{N}^+$ ), tratamientos térmicos (nitruración, difusión y endurecimiento) y aleaciones con  $\text{TiC}$ . [10]

La superficie del biomaterial es muy importante de cara a la respuesta del medio biológico ya que es la que está directamente en contacto. En los implantes de titanio, las etapas normales de fabricación conducen habitualmente a una capa superficial oxidada, contaminada, a veces sometida a esfuerzos,

<sup>7</sup> Anfótero: Dicho de una molécula: Que puede reaccionar como ácido o como base. [4]

<sup>8</sup>PVD: 'Physical Vapor Deposition'. Proceso de recubrimiento termofísico en el que los materiales de revestimiento se vaporizan en una cámara de vacío que con gas reactivo y se depositan en la pieza a tratar. [11]

se deforma plásticamente y no es uniforme. Por esta razón, deben realizarse tratamientos superficiales. Además, dependiendo del tipo de aplicación del dispositivo médico y con que tipo de tejido esté en contacto, se requerirán de ciertas propiedades superficiales específicas que se incluirán mediante dichos tratamientos. A continuación se mencionan diferentes tratamientos clasificados en métodos mecánicos, químicos y físicos, dependiendo del mecanismo de formación de la capa modificada sobre la superficie del material: [10]

- Métodos mecánicos. Se utilizan para producir topografías superficiales específicas, limpiar y crear rugosidad en la superficie y mejorar la adherencia.
  - Mecanizado
  - Pulido
  - Granallado
- Métodos químicos
  - Tratamientos químicos:
    - Tratamiento ácido. Elimina las escamas de óxido y contaminación.
    - Tratamiento alcalino y tratamiento de peróxido de hidrógeno. Mejora la biocompatibilidad, la bioactividad y la conductividad ósea.
  - Recubrimientos Sol-gel. Mejora la biocompatibilidad, la bioactividad y la conductividad ósea.
  - Oxidación anódica. Se utiliza para producir topografías superficiales específicas, mejorar la resistencia a la corrosión y mejorar la biocompatibilidad, la bioactividad y la conductividad ósea.
  - CVD. Se usa para mejorar la resistencia al desgaste, a la corrosión y mejorar la compatibilidad sanguínea
  - Métodos bioquímicos. Mediante la modificación de titanio silanizado, usando tratamientos fotoquímicos o monocapas autoensambladas se puede inducir una respuesta celular y tisular específica por medio de péptidos, proteínas o factores de crecimiento inmovilizados en la superficie
- Métodos físicos
  - Pulverización térmica. Se consigue mejorar la resistencia al desgaste, mejorar la resistencia a la corrosión y mejorar propiedades biológicas.
  - PVD. Mejora la resistencia al desgaste, la resistencia a la corrosión y la compatibilidad con la sangre.
  - Implantación y deposición iónica. Se consigue modificar la composición superficial; mejorar el desgaste, la resistencia a la corrosión y la biocompatibilidad.
  - Tratamiento con plasma. Se utiliza para limpiar, esterilizar, oxidar y nitrar<sup>9</sup> la superficie, además de eliminar la capa de óxido inicial que tiene la superficie.

---

<sup>9</sup> Nitrar: Introducir en un compuesto orgánico un grupo funcional  $-NH_2$ . [4]

### 3.1.4 Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se define como la ausencia de reacciones alérgicas, inmunitarias, etc., en el contacto entre los tejidos del organismo y algunos de los materiales [4]. Es decir, la manera en que afectan los materiales a los tejidos biológicos circundantes. El requisito indispensable para cualquier biomaterial es que este sea biocompatible. Para determinar el grado de aceptación y de toxicidad del material, se puede analizar a diferentes niveles: la interacción entre el material y los tejidos, los efectos de la degradación del material sobre los tejidos, y el análisis de factores mecánicos como la elasticidad o la tenacidad.[9]

Cabe tener en cuenta que siempre que se introduzca un dispositivo médico dentro del cuerpo, implicará una lesión de los tejidos, por lo que siempre irá acompañado de una reacción inflamatoria. Como respuesta inmediata, el cuerpo reacciona con una inflamación aguda, donde los vasos se dilatan y aumenta la permeabilidad capilar. Si continua el sistema alterado, pasa a ser una inflamación crónica, donde se acumulan en la zona afectada fibroblastos, neutrófilos y macrófagos. El proceso de inflamación acaba con la cicatrización de los tejidos.

Tanto el titanio como sus aleaciones, al ser bioinertes y con gran resistencia a la corrosión, se consideran materiales con un alto grado de biocompatibilidad. De forma general, se considera que la cantidad de iones que puede liberar el titanio al medio es ínfima; pero, como ya se ha mencionado, este material tiene un alto desgaste por rozamiento, lo que implica que frente a fuerzas de fricción, se puede producir desprendimiento de partículas, que pueden reaccionar negativamente con el medio. Por este motivo, debido al movimiento constante que deben soportar las articulaciones, no se puede utilizar este material directamente, sin ningún tratamiento, para reemplazos articulares.[9]

### 3.1.5 Prótesis ortopédicas

Las endoprótesis ortopédicas son aquellas necesarias para la sustitución de una articulación. Las prótesis de cadera y de rodilla son las mas frecuentes, aunque existen también prótesis de hombro, codo, tobillo o muñeca. La principal dificultad de las prótesis articulares es la fijación al hueso vivo. Existen dos inconvenientes principales: la diferencia de módulo elástico entre el metal y el hueso, y la encapsulación fibrosa que el organismo generará entorno al metal.[9]

Para permitir una buena actividad osteogénica se puede trabajar con diferentes tipos de superficies. Un ejemplo son los recubrimientos porosos, obtenidos mediante sinterización de partículas de titanio sobre la superficie. Se intentan formar poros mayores que 100µm para que así se forme crecimiento en estos poros y cree una buena fijación con el hueso. Otro ejemplo son las superficies con recubrimiento de hidroxiapatita, una de las estructuras que presentan los fosfatos de calcio en el hueso; la idea es que el organismo reconozca la hidroxiapatita y así el hueso crece en contacto con el implante evitando la formación de cápsulas fibrosas.[9]

Otros usos para el titanio y las aleaciones de titanio son la osteosíntesis y la fijación de la fractura ósea. Los implantes típicos para la osteosíntesis incluyen tornillos óseos, placas óseas, implantes

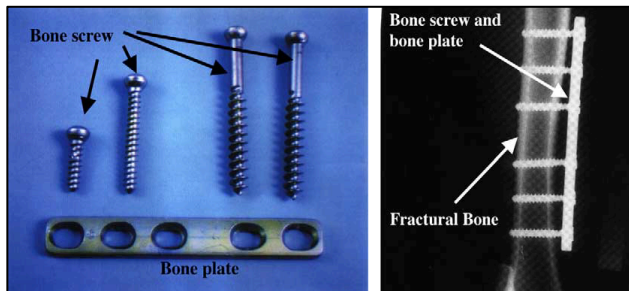


Imagen 3. Imagen y radiografía de tornillos y placa ósea [10]

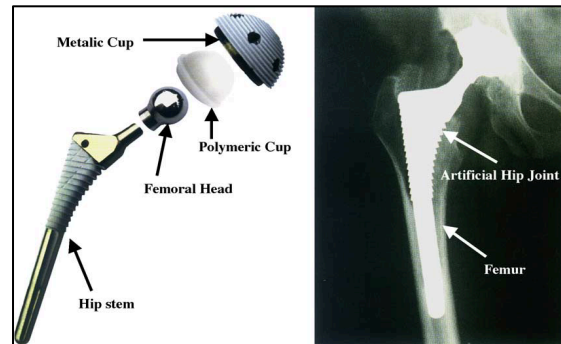


Imagen 4. Esquema y radiografía de una prótesis de cadera [10]

maxilofaciales, etc. Los tornillos óseos se usan como tornillos individuales para la fijación directa del hueso y luego se aplican principalmente para ejercer compresión en el espacio de fractura, también se utilizan para la fijación de placas o otros dispositivos. Las placas óseas se aplican a casi todas las áreas esqueléticas casi como dispositivos de puente e incluso como fijadores internos.[10]

### 3.2 Quitosano

El quitosano (1-4,2-amino-2-desoxi-D-glucano) es el derivado desacetilado de la quitina, un polisacárido lineal que se encuentra principalmente en los exoesqueletos de los artrópodos. Tiene una estructura de carbohidrato policatiónico similar al ácido hialurónico, una molécula de la matriz extracelular. [12]

La quitina (2-acetamido-2-desoxi-b-D-glucosa) es un polisacárido lineal abundante en la naturaleza, el material de soporte estructural del exoesqueleto de crustáceos, insectos, diatomeas, algas marinas y algunas paredes celulares de hongos. Es una molécula muy insoluble que consiste en la repetición de las unidades N-acetil-D-glucosamina, unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) y que tiene un gran parecido con el comportamiento de la celulosa (su solubilidad y baja reactividad química). La estructura de la quitina está altamente relacionada con la de la celulosa ya que la diferencia reside solamente en que el hidroxilo [-OH] en la posición C2 se sustituye por un grupo acetamido [-NHCOCH<sub>3</sub>]. La quitina es un polisacárido blanco, duro, inelástico, nitrogenado. [13]

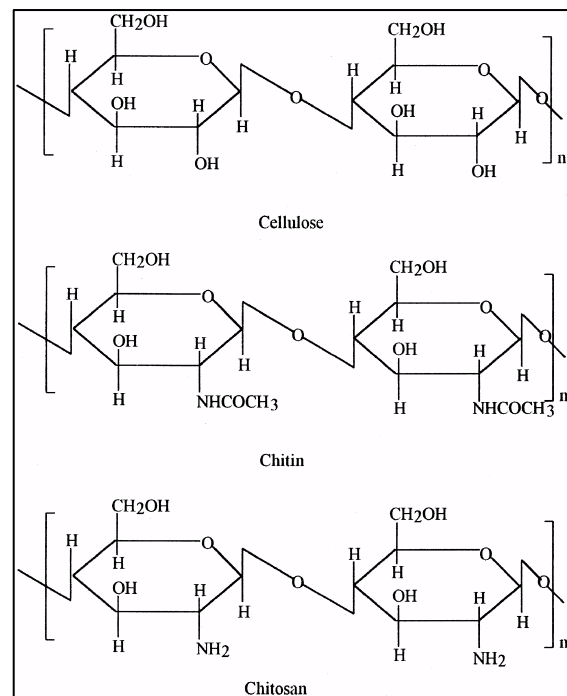


Imagen 4. Estructura química de la celulosa, la quitina y el quitosano [13]

El quitosano, (CS), se realiza a partir de la desacetilación alcalina exhaustiva: esto implica la ebullición de quitina en una concentración alcalina durante varias horas. Aunque esta N-desacetilación casi nunca es completa, por eso se considera el quitosano como un derivado parcialmente N-desacetilado de quitina.

Frente a otros polímeros sintéticos, la quitina y sus derivados tienen la ventaja de que, al ser materiales naturales, su biocompatibilidad y biodegradabilidad son mucho más elevadas. [13]

### 3.2.1 Propiedades fisicoquímicas

#### 3.2.1.1 Peso molecular

La mayor parte de propiedades fisiológicas y propiedades funcionales dependen del peso molecular del quitosano. La distribución del peso molecular en la producción de quitosano está influenciada por las diferentes condiciones que se pueden dar en el proceso de desacetilación. Lo mas frecuente es encontrar quitosano con un peso molecular medio, de varios cientos a más de un millón de Dalton<sup>10</sup>, y con una masa molecular media de hasta 1 MDa. Estos valores corresponden aproximadamente a una longitud de cadena de 5000 unidades. [14]

#### 3.2.1.2 Grado de desacetilación

Uno de los parámetros relevantes a tener en cuenta es el grado de desacetilación del quitosano. Se determina como la relación entre las dos unidades estructurales siguientes: 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranososa. [13]

La quitina se encuentra prácticamente totalmente acetilada y el quitosano es el derivado acetilado N-deácido de la quitina. Según el grado N de desacetilación, el quitosano tiene mas facilidad para ser soluble en ácidos acético y fórmico acuosos diluidos. En la quitina, predominan las unidades acetiladas (grado de acetilación típicamente 0,90). El quitosano es el derivado total o parcialmente N-desacetilado de quitina con un grado típico de acetilación inferior a 0,35. [13]

Dicho parámetro varía en función del procedimiento de preparación. Por ejemplo, según si aumenta el tiempo de tratamiento de la quitina para pasar a quitosano, el grado de desacetilación también aumentará. Este parámetro está directamente relacionado con en el grado de absorción de humedad, la distribución de la carga, la viscosidad intrínseca y solubilidad del quitosano en soluciones acuosas. [14]

#### 3.2.1.3 Propiedades de solubilidad

La principal diferencia entre la quitina y el quitosano se encuentra en su solubilidad. El quitosano tiene un grado N-desacetilada tan alto que se vuelve soluble en ácidos diluidos.

El quitosano puro (pKa=6.3) es insoluble en agua, en medio alcalino e incluso en disolventes orgánicos. Se puede disolver el quitosano con ácidos orgánicos, como por ejemplo el ácido acético

---

<sup>10</sup> Dalton: Unidad de masa atómica equivalente a 1/12 de la masa de carbono 12, muy utilizada en bioquímica y en biología molecular. (Símb. Da).

(con una concentración del 1-10%), ácido fórmico, succínico, láctico, glutámico y málico, o ácidos inorgánicos como por ejemplo el ácido clorhídrico.

La solubilidad del quitosano depende en cierta forma del pH ya que presenta grupos amino ( $-NH_2$ ) que si se encuentran en pH 6 o inferior, protonan por disolución y forman grupos amino catiónicos ( $NH_3^+$ ). El grupo ( $NH_3^+$ ) provoca el aumento de la repulsión eléctrica intermolecular y queda como un polisacárido soluble policationico.

Una vez disuelto, el quitosano forma soluciones viscosas, que podrían funcionar como espesantes, estabilizantes o agentes de suspensión. El intervalo de viscosidad del quitosano comercial (1% relación w/v en ácido acético al 1% y a 25 ° C) es de 10 a 1000 mPa·s. [14]

#### 3.2.1.4 Gelificación del quitosano en presencia de $\beta$ -GP

Al añadir glicerofosfato ( $\beta$ -GP), una base débil, a soluciones de quitosano, la solución del polímero mantiene el pH neutro y se puede activar el proceso de gelificación con ayuda de temperatura.

La adición de esta molécula, aumenta un poco el pH, pero, por otro lado, reduce la repulsión electrostática entre las moléculas de quitosano; se induce a la formación de una estructura similar a un gel con un pH superior a 6,2. [15]

Usando  $\beta$ -GP puede implicar diferentes interacciones, la reducción de la repulsión electrostática, la interacción de enlaces cruzados, disminución del efecto hidrófobo y las interacciones entre enlaces de hidrógeno. Para reducir la repulsión electrostática entre las moléculas de quitosano, actúa sobre la forma monovalente<sup>11</sup> del quitosano y induce puentes iónicos divalentes. [15]

### 3.2.2 Propiedades Biológicas

#### 3.2.2.1 Biodegradación

La soluciones de quitosano en sí, son muy estables durante un largo periodo de tiempo, aunque si se diera el caso de querer degradar el quitosano para alguna necesidad en concreto, o como una forma de dar mas solubilidad al quitosano. Para degradarlo existen diferentes métodos: radiación ionizante o de ultrasonido, mediante degradación oxidativa-reductora y métodos usando enzimas.

Con un método enzimático, la reacción de degradación se puede controlar según el pH, la temperatura y el tiempo. El quitosano es susceptible a la degradación enzimática por enzimas no específicas, por ejemplo: lisozimas, quitinasas, celulasas, proteasas y lipasas. Se debe tener en cuenta ya que si se quiere la solución de quitosano para aplicaciones biomédicas, al cabo de un tiempo, debido a los enzimas mencionados, se irá degradando catalizando la hidrólisis de los enlaces b- (1 → 4) glicosídicos. [15]

---

<sup>11</sup> Monovalente: Dicho de un elemento químico: que tiene una sola valencia. [4]

#### 3.2.2.2 Biocompatibilidad

Es una de las propiedades mas importantes si se usa al quitosano como un biomaterial que se desea implantar en el cuerpo. Afortunadamente, el quitosano es un material que aceptan los tejidos vivos; no provoca reacciones de rechazo ni en las membranas oculares, ni en la piel, ni el tejido epitelial nasal. [15]

La citocompatibilidad del quitosano se ha sido estudiada con diferentes tipos de células. Esta propiedad parece estar relacionada con el grado de desacetilación. Dependen del número de cargas positivas en la solución a la presencia de grupos amino libres; al aumentar dichos factores, la adhesión de las células al polímero es mayor. Por el contrario, la proliferación de células disminuye al aumentar considerablemente el grado de desacetilación. [16]

#### 3.2.2.3 Toxicidad

Una ventaja frente a otros polisacáridos naturales es la baja toxicidad del quitosano. Aunque cabe decir también que está contraindicado para personas con alergia al marisco.

Hay estudios que indican que no produce ningún efecto secundario al ingerir quitosano durante cierto periodo de tiempo. Pero, se debe tener precaución si la exposición al quitosano es durante un largo periodo de tiempo, ya que hay la posibilidad que cause la pérdida de vitaminas liposolubles, la disminución de absorción de minerales y la alteración de la flora bacteriana. [15]

#### 3.2.2.4 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana hacia diferentes microorganismos, bacterias, levaduras y hongos, puede actuar según dos mecanismos principales. El primer mecanismo de inhibición es la interacción con grupos aniónicos en la superficie celular, debido a su naturaleza policatiónica, provoca la formación de una capa impermeable alrededor de la célula, que impide el transporte de elementos esenciales para los microorganismos. El segundo mecanismo implica la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas permeabilizando el núcleo. [16]

Hay diversos factores que afectan a que el quitosano tenga un efecto inhibitorio mayor o menor, y el peso molecular es uno de los factores mas decisivos, así como también afectan en menor medida el pH y el grado de desacetilación. Se observa en diferentes estudios que el quitosano desacetilado al 75% muestra una mayor actividad antimicrobiana en comparación con quitosano desacetilado al 90% y al 50%, lo que significa que hay un punto óptimo de actividad. [16]

### 3.2.3 Aplicaciones

#### 3.2.3.1 Cicatrización de heridas

La quitina y el quitosano activan células del sistema inmunitario como macrófagos o fibroblastos. Estos efectos están relacionados con el grado de desacetilación; a menor grado, mayor efecto. Los

oligómeros<sup>12</sup> de quitosano poseen cierto grado de curación de heridas, debido a su capacidad para estimular la producción de fibroblastos. A consecuencia de la producción de fibroblastes, se aumenta la producción de colágeno que ayuda al crecimiento de tejido conectivo. [16]

### 3.2.3.2 Sistemas de entrega de medicamentos

Una importante aplicación es el desarrollo de sistemas para poder administrar diferentes principios activos.

En la administración de fármacos, la selección de un tipo ideal de quitosano con ciertas características es útil para desarrollar este tipo de sistemas; para ello se debe tener en consideración el peso molecular, la pureza del quitosano y el grado de desacetilación. Así se puede controlar la administración de dichos principios activos en una zona en concreto, prolongando la duración y mejorando su eficacia. [16]

Un mayor grado de reticulación y un mayor grado de desacetilación suben el nivel hidrófobo, controlando así el grado de hinchamiento, absorción del medio circundante y por tanto, la difusión del fármaco que se encuentra atrapado en la matriz de quitosano. Para determinar el grado de reticulación, este va en función del peso molecular; utilizando un peso molecular medio o alto para el quitosano, el empaquetamiento molecular, es decir, la reticulación, será peor que usando quitosano de peso molecular pequeño. [16]

### 3.2.3.3 Ingeniería de tejidos

También es posible el uso de estas matrices de quitosano para dar soporte al tejido dañado ya que estas aportan un ambiente más favorable para la regeneración. Debido a su baja actividad inmunogénica, su biodegradabilidad controlada y su estructura, el quitosano es un material interesante para el diseño de sistemas de ingeniería de tejidos. [16]

Estructuralmente, con un grado de desacetilación mas bajo, el material es mas regular y los poros bastante uniformes. Este hecho tiene una gran influencia para la inserción, proliferación y función celular. Usando colágeno junto a la solución de quitosano y se ha estudiado que con un alto peso molecular se puede prolongar significativamente la biodegradación las muestras con colágeno y quitosano. Por otro lado, usando quitosano de bajo peso molecular con colageno, aceleraba el proceso de proliferación celular. Es decir, que dependiendo de las necesidades y cuales sean los objetivos del estudio, irá mejor un tipo de peso molecular u otro. [16]

---

<sup>12</sup> Oligómeros: Los radicales de una molécula, distintos entre sí.



### 3.3 Doxiciclina

Las tetraciclinas son uno de los grupos de antibióticos más usados y son eficaces tanto para infecciones con bacterias gram-positivas como gram-negativas, además de algunos microorganismos anaerobios. Son antibióticos bacteriostáticos, que actúan inhibiendo la formación de proteínas dentro de la célula bacteriana. [17]

Algunos derivados de la tetraciclina son: minociclina, oxitetraciclina, metaciclina y doxiciclina. Se utilizan con frecuencia en la práctica clínica y se basan en la funcionalidad de la estructura molecular.

La doxiciclina, (DOX), es un miembro del grupo de las tetraciclinas, que es ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones respiratorias y del tracto urinario. La doxiciclina es más soluble en lípidos que otras tetraciclinas y después de su aplicación penetra mejor en los tejidos y fluidos del cuerpo. [17]

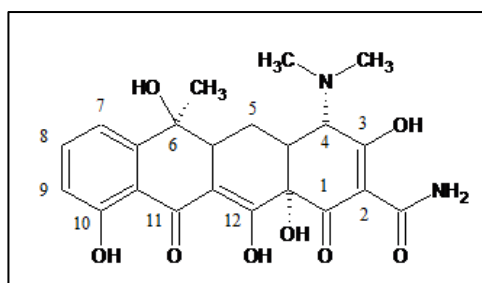


Imagen 5. Estructura química general de las tetraciclinas [18]

#### 3.3.1 Estructura química

El hclato de doxiciclina es la forma hemihidratada y hemietanolada. Su apariencia es polvo cristalino amarillo higroscópico, debe ser almacenado en recipientes herméticos y protegido de la luz. El nombre químico es: 4-(dimetilamina)-1,4,4<sup>a</sup>,5,5<sup>a</sup>,6,11,12<sup>a</sup>-octahidro- 3, 5,10,12,12<sup>a</sup>-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftaceno-carboxamida monohidrato, combinado con alcohol etílico.

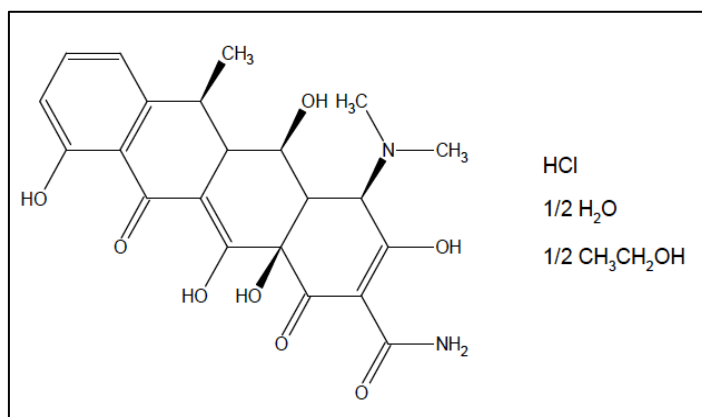
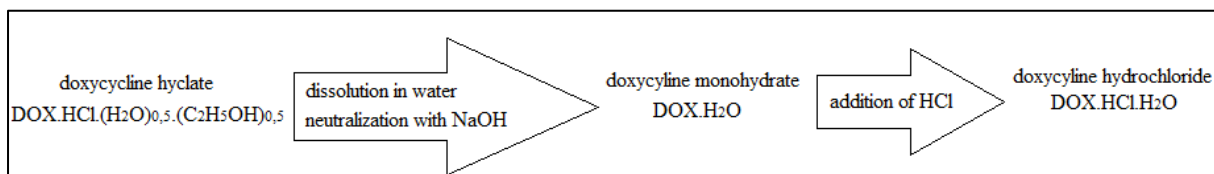


Imagen 6. Estructura química del hclato de doxiciclina [18]

Este medicamento presenta la fórmula molecular  $(C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl)_2 \cdot C_2H_6O \cdot H_2O$ , con un peso molecular de 1025,89 g/mol. El hclato de doxiciclina tiene su temperatura de fusión en 201°C. Los

valores de pKas de tetraciclina son aproximadamente 3-4, 7-8 y 9-10. El hclato de doxiciclina se vende comercialmente en comprimidos dosificados o en polvo liofilizado. [18]

La doxiciclina se presenta en tres formas: hclato, monohidrato e hidrocloreuro. A partir del hclato de doxiciclina es posible obtener las otras formas. El hclato disuelto en agua y neutralizado con hidróxido de sodio se convierte en monohidrato de doxiciclina. Esta segunda forma con la adición de ácido clorhídrico se convierte en hidrocloreuro de doxiciclina. El porcentaje en forma de hclato de doxiciclina es 86,6%, en la forma hidrocloreuro es 89,1% y en forma de monohidrato es 96,1%. [18]



**Imagen 7.** Esquema del proceso para la obtención de las tres formas químicas de la doxiciclina [18]

### 3.3.2 Mecanismos de acción

La acción de las tetraciclinas es inhibir la síntesis de proteínas bacterianas a través de su enlace con el ribosoma<sup>13</sup> 30S bacteriano, impidiendo el acceso del complejo ARNm-ribosoma. Pero además, la DOX es inhibidora de las metaloproteinasas<sup>14</sup> de la matriz extracelular. [18]

Debido a que no se necesitan dosis tan altas para la absorción de Doxiciclina, esta no provoca irritaciones gastrointestinales y la perturbación de la flora bacteriana intestinal. Además, no es interferida por la absorción de alimentos. La dosis diaria recomendada para una persona adulta es de 200 mg, y sus efectos duran entre 12 y 24h.

Alrededor del 80 al 95% de la doxiciclina que circula por el cuerpo, va ligada a las proteínas plasmáticas. La doxiciclina es el compuesto del grupo de las tetraciclinas más soluble en lípidos. Está ampliamente distribuido en tejidos y fluidos. Se debe tener precaución, ya que con problemas renales o hepáticos, no se expulsa adecuadamente y se crea una acumulación de doxiciclina en el cuerpo. [18]

### 3.3.3 Aplicaciones clínicas

La tetraciclinas se suelen administrar como antibióticos de amplio espectro para el tratamiento de infecciones; además, otra aplicación que no tiene nada que ver es que a veces se administran como complemento nutricional para el crecimiento de animales. Se suele escoger la doxiciclina por que se absorbe mejor que otras tetraciclinas y su vida promedio es mas larga; sobretodo se receta para combatir infecciones en las vías respiratorias, zona donde los patógenos son muy resistentes. [18]

<sup>13</sup> Ribosoma: Orgánulo celular en el que tiene lugar la síntesis de proteínas.

<sup>14</sup> Metaloproteinasa: Enzima que genera la proteólisis.

Las soluciones de doxiciclina también se usan algunas veces para sangrados internos en situaciones donde hay un aumento en la cantidad de fluidos debido a tumores malignos y linfomas de pulmón, de mama y de ovarios. También se suele utilizar para tratar la prostatitis crónica, la sinusitis, la sífilis, la clamidia y la enfermedad inflamatoria pélvica; además, actúa en contra de los protozoos de los parásitos que inducen la malaria. [18]

### 3.4 Carvacrol

El carvacrol (CRV) es uno de los componentes principales (estructura química de un fenol) que se encuentra presente en el aceite esencial que se puede extraer del romero o el orégano. Tradicionalmente se han usado estas plantas como remedios caseros para dolencias digestivas. En parte, este efecto podría ser debido a las propiedades antibacterianas y antiinflamatorias que se le atribuyen al carvacrol

#### 3.4.1 Estructura química

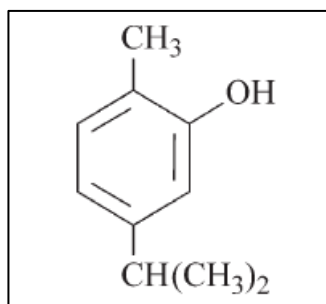


Imagen 8. Molecula del carvacrol [19]

El nombre químico del carvacrol es: 2-Metil-5-(1-metiletil)fenol ( $C_{10}H_{14}O$ ) con un peso molecular de 150.21 g/mol.

Se presenta en forma de aceite, con una temperatura de ebullición de  $237^{\circ}C$  y una densidad de 0.967ml/g. Es completamente hidrófobo, y por tanto, para diluir en agua, necesitará de la ayuda de algún surfactante con el que se creen micelas y poder tener una disolución homogénea. Sin embargo, es soluble en etanol.

#### 3.4.2 Mecanismos de acción

El principal efecto que parece actuar sobre las células es hacen permeable la membrana celular. Es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias gramnegativas y liberar los lipopolisacáridos, de esta forma aumenta la permeabilidad de la membrana. [20]

El carvacrol interactúa con la membrana celular y disuelve la bicapa de fosfolípidos. Esta distorsión de la estructura provocaría la desestabilización de la membrana. Las mediciones intracelulares y extracelulares de ATP muestran que el nivel de ATP dentro de la célula es menor que el externo. Por otro lado, los niveles intracelulares de iones de potasio y de iones de fosfato disminuyeron por lo que se puede acabar entendiendo que el carvacrol forma canales a través de la membrana separando las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos, permitiendo que los iones abandonen el citoplasma.

Además, a parte de la alteración de las membranas, también es capaz de inhibir ciertas toxinas de *B.Cerus*. [20]

### 3.4.3 Aplicaciones

El carvacrol puede ser usado como antioxidante que elimine los radicales libres. Los radicales libres del oxígeno son formados en el proceso metabólico celular. Cuando el radical superóxido ( $O_2$ ) o el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el radical hidroxilo (OH) se acumulan, puede provocar daños en los tejidos y la supresión de ciertas funciones celulares. Se ha observado en estudios que el carvacrol, como antioxidante, ayuda a la eliminación de radicales libres. Probablemente, es debido a la existencia del grupo hidroxilo (OH) que está unido al anillo. Al ser el carvacrol de carácter ácido, facilita las reacciones con radicales libres se facilita debido a su débil carácter ácido. La reacción sucede con la cesión de átomos de hidrógeno del carvacrol a un electrón desemparejado, produciendo otro radical que se estabiliza por dispersión de electrones. [21]

## 4. Técnicas aplicadas

En este capítulo se describirán los principios de funcionamiento y la operatividad de los diferentes equipos de análisis utilizados durante la realización del Proyecto para la caracterización de las muestras.

### 4.1 Espectrofotómetro UV-VIS

La espectrofotometría es el procedimiento analítico para medir la cantidad de luz absorbida por una sustancia con respecto a una longitud de onda determinada. Al incidir un haz de luz monocromática sobre una muestra homogénea, según la intensidad del haz, parte de esta luz incidente es absorbida, y la otra parte transmitida.

En la práctica, el equipo usado es el UV-3600 del fabricante SHIMADZU. El funcionamiento del espectrómetro UV-VIS-NIR se basa en tres detectores: un PMT (tubo fotomultiplicador) para las regiones ultravioleta y visible y un detector InGaAs que asegura una alta sensibilidad a lo largo de toda la gama de longitudes de onda medidas y un detector PbS enfriado para la región del infrarrojo cercano. [22]

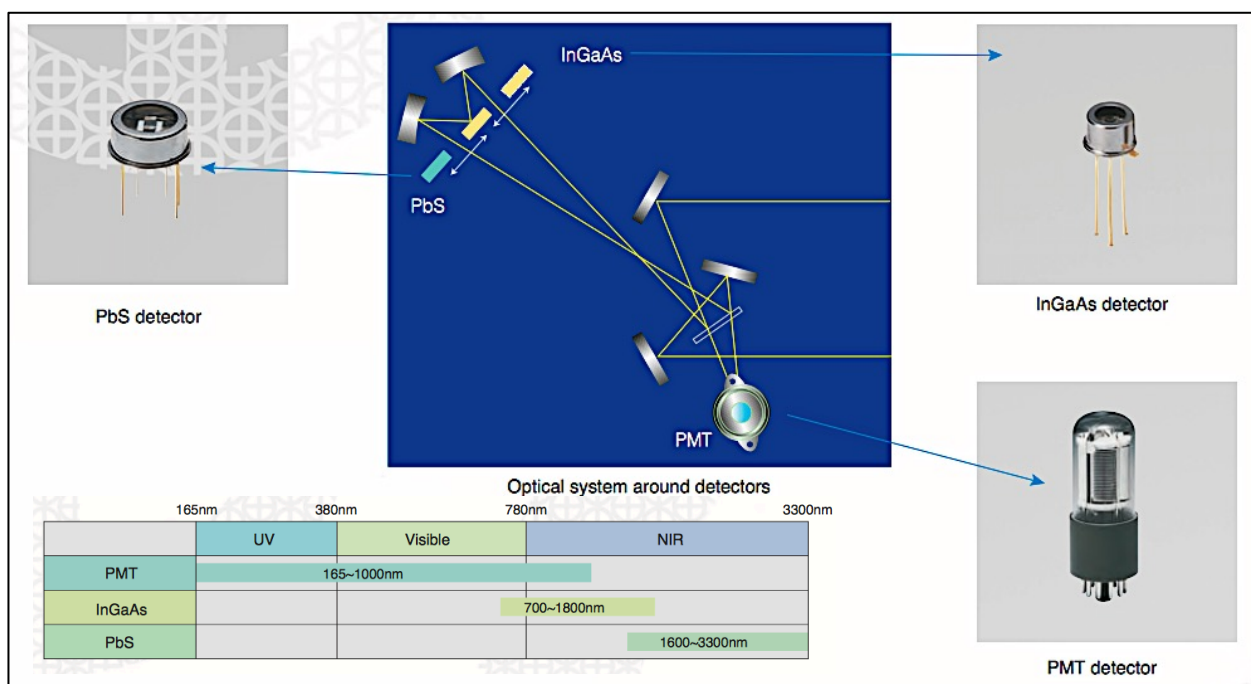
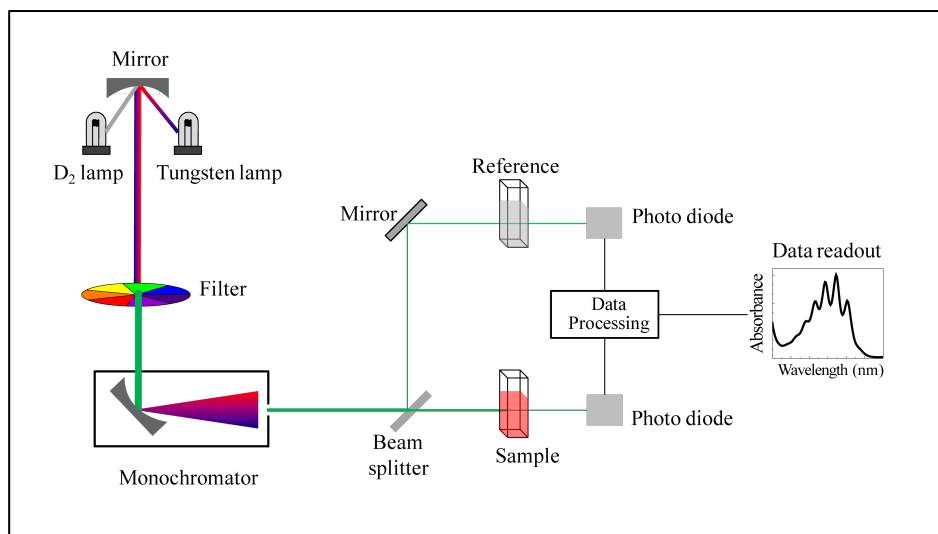


Imagen 9. Sistema de sensores del espectrofotómetro [22]

El equipo tiene una alta sensibilidad a lo largo de toda la gama de longitudes de onda medidas, y da un nivel de ruido de 0,00003 Abs a 1500 nm y con una resolución máxima del equipo de 0,1nm. El

amplio rango de longitudes de onda de 185 a 3.300 nm permite la medición en las regiones ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. [22]



**Imagen 10.** Esquema de funcionamiento de un espectrofotómetro

#### 4.1.1 Microplate



**Imagen 10.** Microplate gen 5

El equipo microplate Gen 5 Synergy, del fabricante BioTeck, te permite la medición de absorbancia UV-Vis, fluorescencia y luminiscencia para microplacas de 6 a 384 pocillos, recogiendo y guardando todos los datos de las lecturas.

La decisión de usar este equipo, a pesar de tener menos sensibilidad que el equipo anterior, es debido a que permite realizar ensayos de cinética, controlar la temperatura y hacer un *shake* si es necesario.

A diferencia del anterior, la medida no se basa en ninguna muestra de referencia, directamente mide la absorbancia de cada pocillo de la placa. Se debe tener en cuenta que la medición se hace de forma longitudinal, por lo que el volumen de solución de cada pocillo afectará a la lectura. [23]

## 4.2 Interferometría de luz blanca

La idea básica del funcionamiento de interferometría consiste en dividir en dos mitades iguales un haz de luz blanca usando lo que se llama un divisor de haz, es decir, un espejo semi-transparente. Este espejo semi-transparente es una pieza de cristal cubierta con una capa de plata muy fina sobre la superficie. [24]

Cuando los dos haces de luz se encuentran en la pantalla, se superponen e interfieren, y la diferencia de fase entre ellos crea un patrón de áreas claras y oscuras (en otras palabras, un conjunto de franjas de interferencia). Mediante la inspección y medición de las franjas, se puede calcular con gran precisión las diferentes medidas a estudiar. [24]

Este equipo nos permite hacer un análisis de la topografía superficial de las muestras y la posibilidad de visualizar en modo 3D la rugosidad de las superficies.

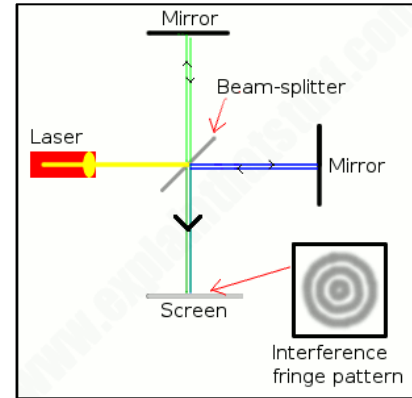


Imagen 11. Esquema de funcionamiento de un Interferómetro [24]

El equipo utilizado es Wyko NT9800/9300 Surface Profiler del fabricante Veeco. El equipo incluye:

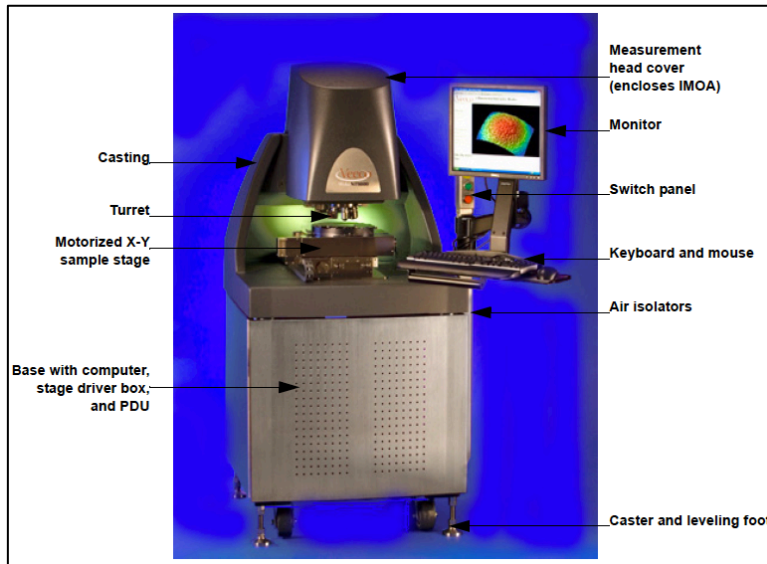


Imagen 12. Partes del Interferómetro usado [25]

- Un conjunto óptico modulado (IMOA) montado en un eje Z motorizado y una base con inclinación automatizada.
- Una base para poner la muestra motorizada en los ejes X-Y.
- Varios objetivos de ampliación montados en una torreta motorizada y con un adaptador
- Una mesa integrada aislante de vibraciones.
- Un procesador Pentium®, precargada con Microsoft Windows XP y el Software Wyko Vision. [25]

### 4.3 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

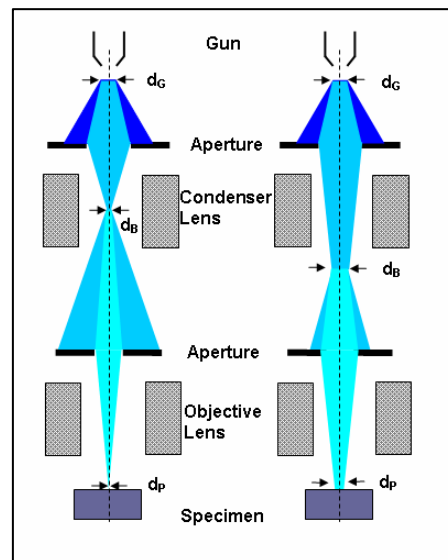
El funcionamiento general del microscopio electrónico de barrido es disparar electrones sobre la muestra a analizar y de esta forma, al chocar con la muestra, se provoca una dispersión e interacción entre los electrones. Los principales componentes de este equipo son una fuente de energía que produce los haces de electrones (puede ser de tres tipos: Filamento de tungsteno, Filamento de hexaboruro de lantano, Emisor de efecto de campo), unas lentes que controlan el diámetro del rayo del foco que incide sobre la muestra, unas rejillas metálicas que funcionan como aperturas que modifican las propiedades del rayo, un controlador de la posición y orientación de la pieza, y una cámara de vacío. [26]

Las lentes electromagnéticas se utilizan para ampliar la imagen de la fuente de haz que sale del cañón de electrones y para enfocar el haz sobre la muestra.

Se puede variar el voltaje de aceleración de <1 kV a 30 kV. De esta forma, al aumentar el voltaje, disminuye los defectos de la lente, el diámetro del haz se hace mas pequeño y por tanto aumenta la resolución. Para mantener un buen contraste de la imagen es necesario mantener un mínimo de corriente para así obtener una alta relación de señal/ruido. [26]

Al incidir el haz de electrones sobre las piezas se pueden producir diferentes efectos que nos aportan diferente información, según el modo en el que nos encontremos:

- Electrones secundarios: los electrones que pasan muy cerca del núcleo del átomo de la muestra, lo que le aporta suficiente energía para que el electrón salte fuera de la muestra. Estos electrones son de muy baja energía (menor que 5eV) por lo que deben estar muy cerca de la superficie para poder rebotar fuera de la muestra.
- Electrones retrodispersados: son los electrones del haz que chocan directamente con el núcleo de los átomos, provocando una repulsión entre ambos. La intensidad esta interacción varía según el número atómico de los elementos que forman la muestra, con lo que se puede acabar obteniendo información sobre la composición superficial de la muestra. [27]



**Imagen 13.** Esquema de funcionamiento del SEM [26]

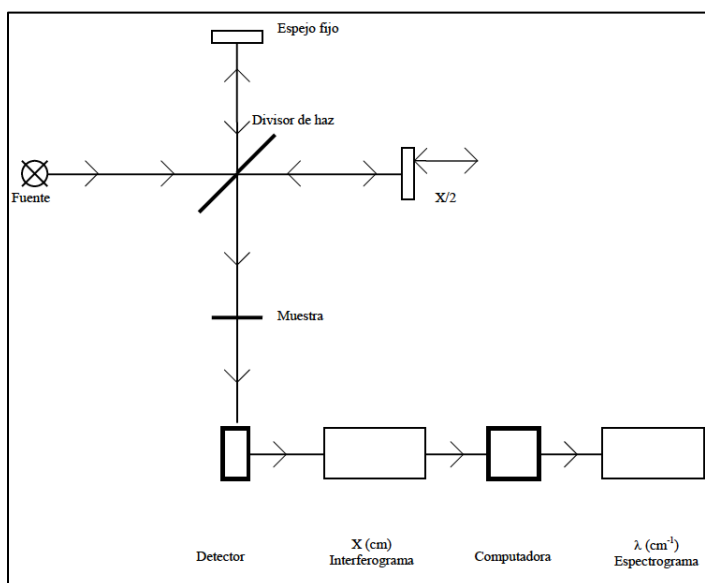
#### 4.4 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR/ATR)

Al incidir un vector eléctrico de radiación infrarroja, si este oscila a la misma frecuencia que el momento dipolar de la molécula, habrá interacción. El espectro que resulta de esta interacción indica la transmisión de la radiación que ha interactuado con la muestra, cada pico indica la presencia de diferentes enlaces, con lo que se puede identificar de qué molécula se trata. Existen dos tipos de espectrómetros: los dispersivos y los de transformada de Fourier.

El espectrómetro por Transformada de Fourier consta de tres elementos básicos, una fuente de luz, un interferómetro de Michelson<sup>15</sup> y un detector, tal y como se puede observar en la imagen 14.

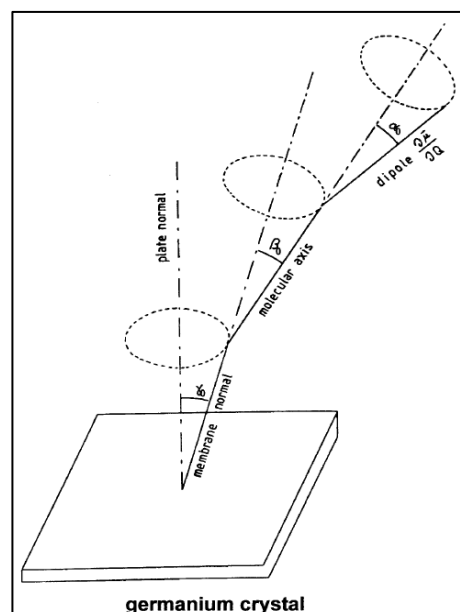
<sup>15</sup>Interferómetro de Michelson: produce franjas de interferencia mediante la división de un haz de luz monocromática, de modo que un rayo golpea un espejo fijo y el otro un espejo móvil. Cuando





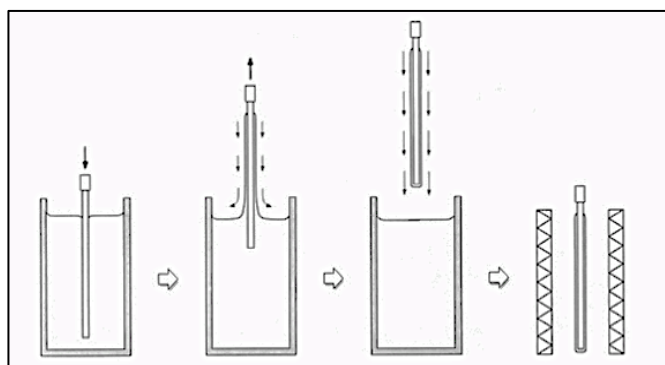
**Imagen 14.** Funcionamiento esquemático del FTIR [27]

La espectroscopia infrarroja por Reflectancia Total Atenuada (ATR) es usado sobretodo para el análisis de solidos opacos, de alta densidad. El funcionamiento se basa en la reflexión de la radiación al incidir entre dos medios de distinta densidad óptica. Cuanto mayor sea el ángulo de incidencia, mayor será la reflexión, para ello se debe colocar la pieza sobre un cristal de germanio (que tiene un alto índice de refracción).



**Imagen 15.** Funcionamiento esquemático de la reflectancia del ATR [28]

## 4.5 Dip-Coating



**Imagen 16.** Esquema proceso de un Dip-Coating

La técnica de Dip-Coating es un método de recubrimiento por inmersión, en la cual, controlando la velocidad de inmersión, el tiempo de espera y la velocidad de extracción, se puede controlar el grosor de la capa. Se forman enlaces débiles con la superficie de la pieza (Ti) y la solución se adhiere.

En este proyecto, se utiliza un equipo de Dip-Coating manual, por lo que la velocidad de inmersión ira controlada por el movimiento de un contrapeso.

## 4.6 Autoclave

El equipo de autoclave sirve como método para esterilizar, ya sean elementos sólidos como soluciones.

El proceso de funcionamiento del autoclave es bastante sencillo y se puede diferenciar en tres fases.

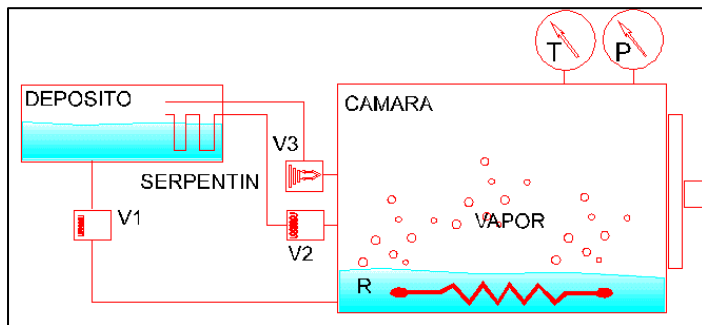


Imagen 17. Sistema de autoclave [29]

La fase de purgado: una resistencia calienta el depósito del agua provocando vapor que se va desplazando hasta llegar a la cámara, cuando se alcanza la temperatura de esterilización, la válvula de purga (V3) se cierra impidiendo el paso de mas vapor. La fase de esterilización: se inicia el proceso de esterilización

manteniendo el producto que se quiere tratar a una temperatura y presión concretas durante un tiempo determinado. Finalmente, la fase de descarga: la resistencia deja de funcionar, la válvula de escape de vapor (V2) se abre, y se espera a que la cámara recupere los valores de temperatura y presión iniciales. [29]

## 5. Materiales y métodos de caracterización

---

### 5.1 Condiciones de estudio

Para proceder a la realización del estudio, se deben tener claros los pasos a seguir, los materiales con los que se trabajará y la maquinaria que se debe utilizar. Estableciendo una estructura clara del Proyecto, se podrá llevar a cabo una línea de trabajo continua para así poder acabar obteniendo los resultados del Proyecto.

El procedimiento es el siguiente:

- Materiales:
  - Titanio
  - Quitosano
  - Principios activos:
    - Doxiciclina
    - Carvacrol
- Técnicas/ Equipos utilizados:
  - Máquinas de pulir
    - Embutidora
    - Pulidora
  - Speed-Mixer
  - Dip-Coating
  - Equipos para la caracterización de la superficie
  - Cabina de bacterias
  - Cabina de células

El procedimiento que se quiere estudiar, tal y como ya se ha mencionado en los objetivos, es el efecto que tiene el recubrimiento multicapa en la liberación de principios activos. Para ello, se realizará una batería de muestras para cada ensayo.

Las condiciones a estudiar son las siguientes:

- Ti con recubrimiento de quitosano (pieza de control)
- Ti con recubrimiento de una sola capa de quitosano cargada
  - Recubrimiento de quitosano cargado con Doxiciclina
  - Recubrimiento de quitosano cargado con Carvacrol
- Ti con recubrimiento de dos capas:
  - La capa interior formada por quitosano cargado:
    - Recubrimiento de quitosano cargado con Doxiciclina

- Recubrimiento de quitosano cargado con Carvacrol
- La capa externa formada por quitosano solo
- Ti con recubrimiento de tres capas:
  - La capa interior formada por quitosano cargado:
    - Recubrimiento de quitosano cargado con Doxíciclina
    - Recubrimiento de quitosano cargado con Carvacrol
  - La segunda y tercera capas mas externas formadas solamente por quitosano

Objetivos de estudio para este Trabajo:

- La facilidad de liberación de los dos principios activos
- Las propiedades físico-químicas de la superficie:
  - La presencia de quitosano, doxixiclina y carvacrol en las diferentes muestras mediante el equipo de FTIR-ATR.
  - La rugosidad y el espesor de los recubrimientos mediante Interferometría de luz blanca.
  - El acabado superficial y la topografía de los films con la ayuda del SEM.
- Las propiedades mecánicas: la fuerza de unión de las diferentes condiciones a estudiar
- Las propiedades biológicas:
  - El efecto antibacteriano mediante el ensayo bacteriológico
  - La biocompatibilidad y citotoxicidad mediante el ensayo de adhesión celular

## 5.2 Preparación de las muestras

Todo el proceso se estudiará sobre discos de Titanio ya mecanizados que facilita el laboratorio del departamento CMEM.

### 5.2.1 Embutidora

Para tener el acabado superficial idóneo de las piezas de titanio, se deben incrustar los discos en una pieza de baquelita<sup>16</sup>. Este proceso de incrustación se hace mediante una embutidora LaboPress-3 Struers. Especificamos que las condiciones de embutido de la baquelita sean las siguientes:

- Fuerza aplicada: 15 N
- Tiempo de calentamiento (180º): 6 minutos
- Tiempo de enfriamiento: 2.5 minutos

---

<sup>16</sup> Baquelita: Resina sintética que tiene mucho uso en la industria, especialmente en la preparación de barnices y lacas y en la fabricación de productos moldeados.

De esta forma, juntamos en una misma pieza de baquelita 5 discos de titanio que luego encajará perfectamente en la pulidora.

### 5.2.2 Pulidora

Para pulir los discos de titanio y conseguir un acabado superficial perfectamente liso (efecto espejo) se usa la pulidora automática RotoPol-31 Struers. Se colocaran las diferentes baquelitas en cada una de las seis posiciones que te permite la pulidora y se preseleccionará la cantidad de fuerza aplicada a cada una de las baquelitas, la velocidad a la que girará el motor y el tiempo que se estará puliendo.

Para determinar cada una de las variables mencionadas, se respeta el protocolo establecido en el laboratorio:

Grado de rugosidad del papel	Fuerza (N)	Velocidad (rpm)	Tiempo de duración (min)
p-800	15	150	10
p-1200	15	150	10-20
p-2500	15	150	10-20
p-4000	15	150	20
Papel de Terciopelo	10	300	30

Para cada uno de los pasos de pulido mencionado se le aplica agua en forma de goteo para disminuir la fricción y el deterioro de las piezas, excepto con el papel de terciopelo que se le va aplicando de forma continua una solución de Silica al 0.06µm al 50% para conseguir el acabado de espejo.



**Imagen 18 y 19.** Piezas de baquelita con discos de titanio ya pulidos y pulidora Rotopol-31



### 5.2.3 Extracción y limpieza de muestras

Para la extracción de los discos de titanio y la separación de estos de la baquelita, se requerirá de la ayuda de una sierra

Para limpiar las muestras y quitar cualquier tipo de impureza que puedan tener, las piezas se sumergen en los diferentes productos químicos que se definen en el siguiente protocolo establecido por el laboratorio:

1. Ciclohexano durante 5min en ultrasonidos (x3 iteraciones).
2. Isopropanol durante 5min en ultrasonidos s (x3 iteraciones).
3. Agua destilada durante 5min en ultrasonidos (x3 iteraciones).
4. Etanol durante 5min en ultrasonidos (x3 iteraciones).
5. Acetona durante 5min en ultrasonidos (x3 iteraciones).
6. Secar con Nitrogeno a presión.



**Imagen 20.** Equipo de Ultrasonidos para limpiar las muestras

## 5.3 Recubrimiento del titanio

Para el recubrimiento de las piezas de titanio, a continuación se detalla el contenido de cada una de las soluciones con las que se reproducirán las diferentes condiciones de estudio.

### 5.3.1 Solución de quitosano

Para la solución de quitosano, se hace una mezcla homogénea con propiedades viscosas. La proporción viene determinada por la combinación de diferentes estudios ya hechos en la bibliografía, más el estudio de encontrar las proporciones que sean más idóneas para obtener un secado mas rápido.

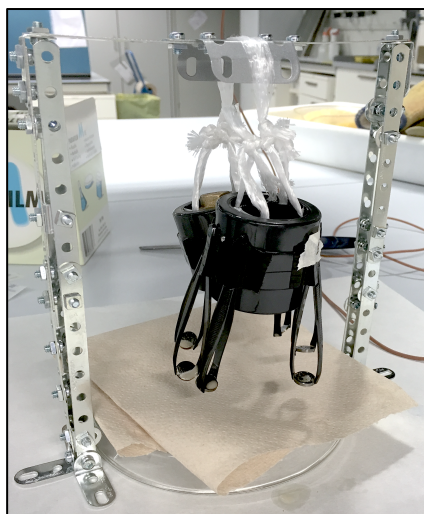
Los reactivos utilizados son los siguientes:

- Quitosano en polvo, de peso molecular medio: 190.000-300.000 Da (Sigma-Aldrich).
- $\beta$ -GP en polvo (Sigma-Aldrich).
- Ácido acético glacial, químicamente puro (Panreac).
- Agua destilada por osmosis inversa (Milli-Q, Merck Millipore).

La composición de la solución final es la siguiente usando una relación w/v:

- Quitosano en polvo: 1%
- $\beta$ -GP en polvo: 0.75%
- Disolución de ácido acético al 2%: 98.25%

### 5.3.2 Quitosano cargado con Doxiciclina



Para la solución de CS cargada con DOX, las proporciones a que se han utilizado, se han decidido en base previos cálculos aproximados sobre las cantidades necesarias para asegurar la posterior lectura de la liberación con el Microplate. Se ha seguido este método debido a que en ensayos anteriores, con concentraciones convencionales (mas bajas), no se llegan a las concentraciones mínimas de lectura del equipo.

La composición final será:

- Solución de quitosano: 85%
- Doxiciclina en polvo (Sigma-Aldrich): 15%

Cabe decir que hay que tener en cuenta que de esta solución, el volumen que se adhiere al disco de titanio es mínimo, por lo que la cantidad absoluta que habrá en cada muestra será muy baja.

Para asegurar la homogeneización de la solución, se usará el Speed-Mixer, un equipo que mezcla soluciones a 3600rpm.

### 5.3.3 Quitosano cargado con Carvacrol

Siguiendo el mismo razonamiento que con la doxiciclina, los porcentajes han sido calculados para que la lectura con el Microplate sea factible. Como el Carvacrol es un aceite hidrófobo, se debe utilizar un surfactante, en este caso Tween80, para realizar una mezcla homogénea.

La composición final será:

- Solución de quitosano: 70%
- Carvacrol en estado oleoso (Sigma-Aldrich): 20%
- Tween 80 solución viscosa(Sigma-Aldrich): 10%

Para asegurar la homogeneización de la solución y conseguir que las micelas que se forman sean muy pequeñas, se usará el Speed-Mixer, un equipo que mezcla soluciones a 3600rpm.

### 5.3.4 Dip-Coating

Este proceso se lleva a cabo mediante la estructura de la Imagen 20. En las pinzas se colocan las piezas de Ti, con el contrapeso de detrás se controla el movimiento de dichas piezas y así se pueden sumergir en las diferentes soluciones preparadas para realizar las diferentes condiciones de estudio.

Para controlar que todas las piezas tengan un espesor de recubrimiento parecido, se establece una velocidad lo mas continua posible, haciendo que tanto la inmersión como la extracción de las piezas dure 10 segundos. Sobretudo es importante el tiempo que tarda en salir porque determina la deposición que va quedando en el disco.

### 5.3.5 Estabilización del quitosano y proceso multicapas

Para cada inmersión en la solución de quitosano, luego se debe esperar 24h a temperatura ambiente para que la cobertura de las piezas se seque.

Como ya se ha mencionado en el apartado de teoría, el quitosano, al diluirlo en ácido acético, queda protonado con un grupo amino  $\text{NH}_3^+$ . De esta forma, si el film de quitosano ya seco se pone en contacto con agua, este se deshará. Por tanto, lo que se hace es, una vez están secas las piezas, se

sumergen en una solución de la sal Tripolifosfato de sodio durante 5 minutos, para que este grupo amino pase a convertirse en el grupo  $\text{NH}_2$ . De este modo, neutraliza el film de quitosano.

Para las diferentes condiciones se procede de la siguiente manera:

- Piezas con una sola capa:
  - Los discos de titanio se sumergen en una solución de quitosano cargado con DOX o CRV y se dejan secar
  - Se bañan en TPP y se vuelven a dejar secar.
- Piezas con dos capas:
  - Los discos de titanio se sumergen en una solución de quitosano cargado con DOX o CRV y se dejan secar
  - se bañan en TPP y se vuelven a dejar secar
  - Posteriormente, se vuelven a sumergir en una solución de quitosano solo y se dejan secar otras 24h
  - se hace un segundo baño de TPP y se dejan secar de nuevo
- Piezas con tres capas:
  - Los discos de titanio se sumergen en una solución de quitosano cargado con DOX o CRV y se dejan secar
  - se bañan en TPP y se vuelven a dejar secar
  - Posteriormente, se vuelven a sumergir en una solución de quitosano solo y se dejan secar otras 24h
  - se hace un segundo baño de TPP y se dejan secar de nuevo
  - Finalmente, se vuelven a sumergir en una solución de quitosano solo y se dejan secar otras 24h



- se hace un tercer baño de TPP y se dejan secar.

Hay que hacer mención a que gracias a este proceso se pueden obtener piezas de titanio recubiertas por las dos caras y que durante todo el proceso se pueden mantener siempre en la misma posición.

## 5.4 Ensayo de liberación de los principios activos

En este apartado determinamos que procedimientos hemos seguido para llevar a cabo el estudio de liberación.

### 5.4.1 Microplate

Una vez tenemos lista toda la batería de muestras, podemos realizar un ensayo cinético de varias horas. Configuramos el Microplate con las siguientes especificaciones:

- Temperatura: 37°C
- Inicio de la cinetica- Duración: 24h
- Agitación orbital antes de la lectura
- Intervalo entre cada lectura: 1min 30s
- Lectura a una absorbancia específica (dependiendo si es DOX o CRV)

Como los discos de titanio son opacos, la luz que incide no puede medir la absorbancia y por tanto lo que se hace es modificar las placas donde se ponen las muestras. Se rompen los puentes entre los diferentes pozos para conectar el pozo que tiene una muestra de titanio y el de al lado. Como habrá la misma concentración en ambos pozos, se medirá la absorbancia en el pozo de al lado del titanio. (Imagen 22)



Imagen 22. Placa modificada

El estudio de liberación se hará en un medio que simula el medio fisiológico, PBS. Son unas sales diluidas que simulan la salinidad y el pH del cuerpo. Se debe controlar la cantidad de solución que se pone, teniendo en cuenta la altura y por tanto el volumen de cada pieza, porque todas las medidas están hechas para pozos que contengan 0,75ml cada uno.

El PBS (Phosphate Buffered Saline) es una solución con las siguientes concentraciones<sup>17</sup>:

- 1% NaCl
- 0,025% KCl
- 0,18%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,03%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

#### 5.4.2 Liberación de la doxiciclina

Para controlar la liberación de la DOX, se sabe que el punto de absorción de la molécula es a la longitud de onda de 351nm [18].

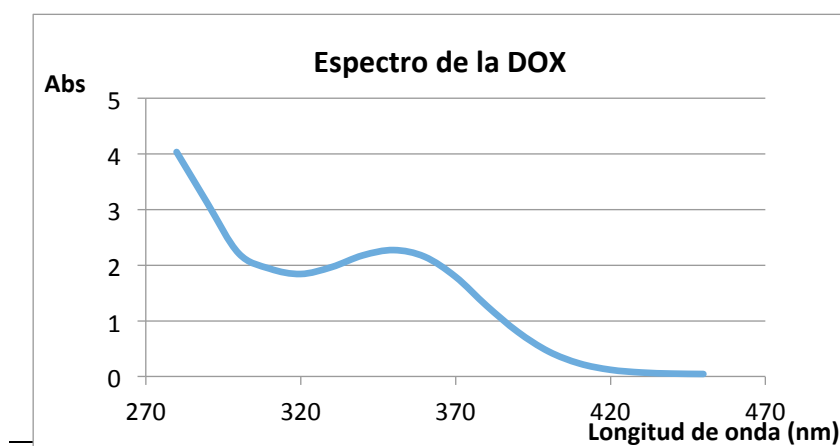


Figura 1. Espectro de la DOX

<sup>17</sup> Información dada por el fabricante Sigma-Aldrich

Para obtener los resultados en función de la concentración de DOX que la capa de quitosano va liberando, y poder cuantificar las diferencias entre las diferentes condiciones se debe encontrar la recta de calibración para la DOX, en la que relacione la cantidad de absorbancia medida en función de la concentración.

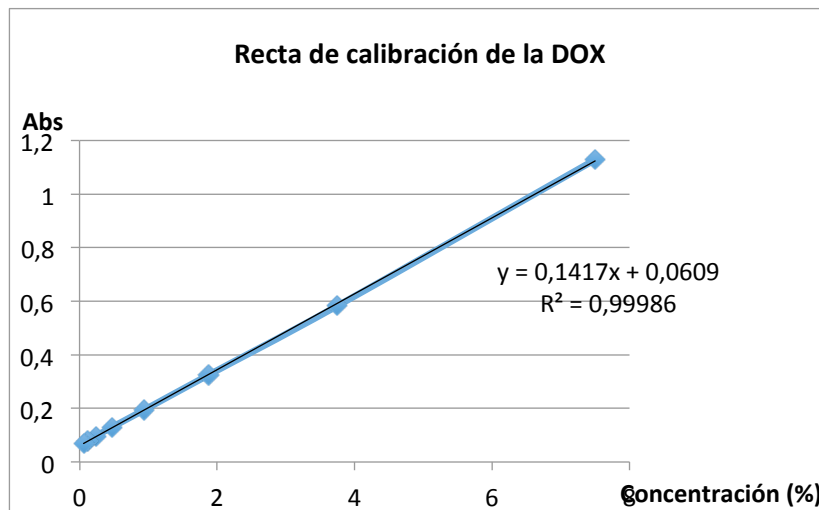


Figura 2. Recta de calibración de la DOX

#### 5.4.3 Liberación del carvacrol

Para controlar la liberación del carvacrol, se sabe que el punto de absorción de la molécula es a la longitud de onda de 267nm, pero como la placa que se usa absorbe a 260 nm, nos falsea el resultado, así que cogeremos un valor un poco mas alejado, 290nm. El Tween80 que se usa, se ha comprobado que no afecta a la medida de absorción. Se observa que es un método válido al comprobar que, a 290 nm, la placa no tiene ningún efecto de absorción, pero en cambio, se continua leyendo la presencia de carvacrol.

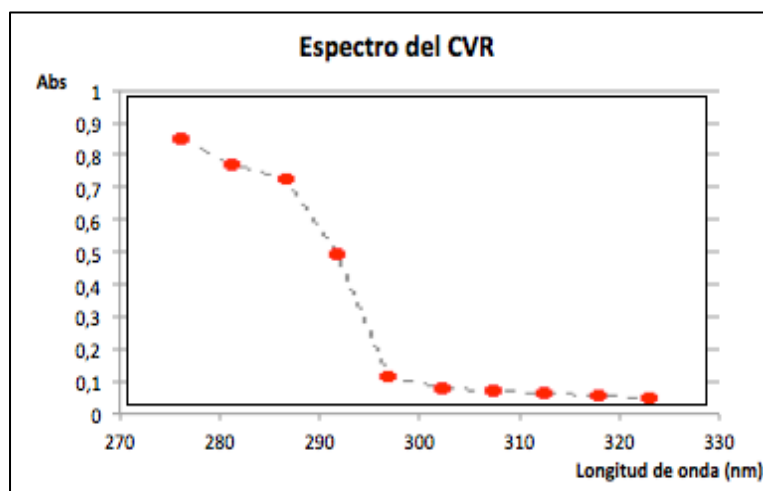


Figura 3. Espectro del CVR

Para obtener los resultados en función de la concentración de CVR que la capa de quitosano va liberando, y poder cuantificar las diferencias entre las diferentes condiciones se debe encontrar la recta de calibración para la CVR, en la que relacione la cantidad de absorbancia medida en función de la concentración.

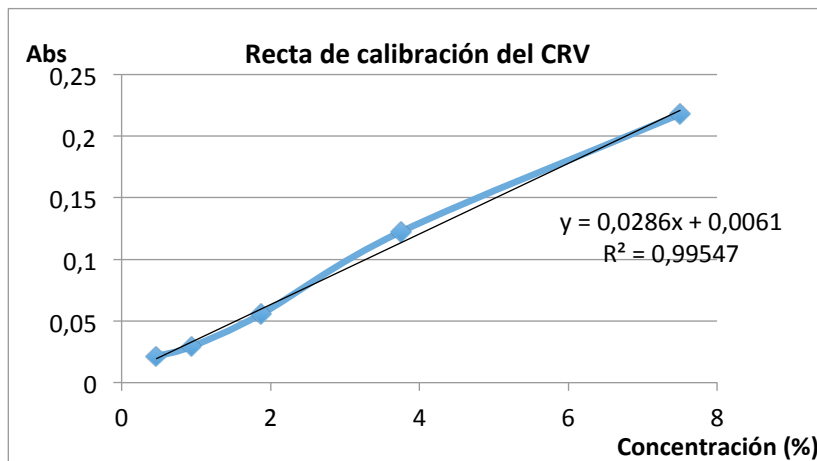


Figura 4. Recta de calibración del CRV

## 5.5 Caracterización del recubrimiento

### 5.5.1 Caracterización del Quitosano, la Doxiciclina y el Carvacrol

Para asegurar la presencia de los componentes usados en las soluciones de quitosano solo y quitosano cargado con doxiciclina y carvacrol, se utilizará el equipo FTIR-ATR para medir la Transmitancia al aplicar luz IR.

Como se puede observar en las imágenes, se presiona cada una de las muestras de titanio con un pequeño cristal de germanio.

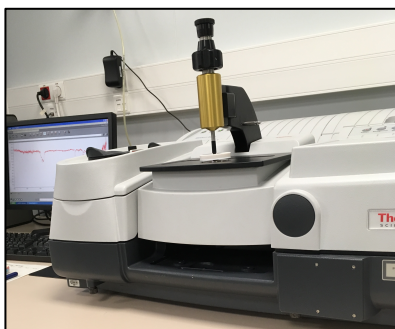
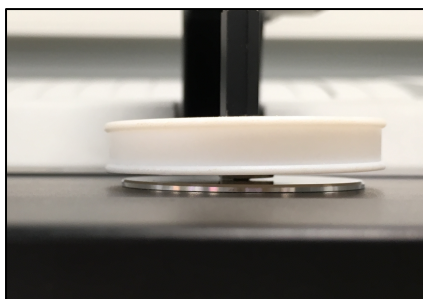


Imagen 23 y 24. Equipo ATR para la caracterización de los materiales

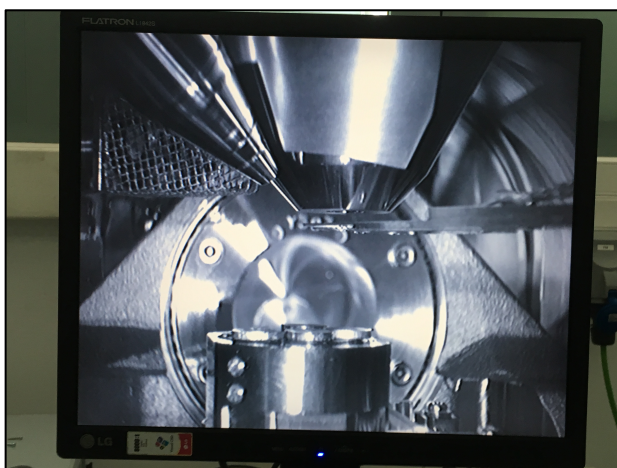
### 5.5.2 Caracterización del acabado superficial

Para analizar el acabado superficial, su topografía y comparar entre las diferentes condiciones se preparan las siguientes muestras:

- Disco de Ti cubiero con una capa de CS
- Disco de Ti cubiero con una capa de CS+DOX
- Disco de Ti cubiero con dos capas de CS+DOX
- Disco de Ti cubiero con una capa de CS+CVR
- Disco de Ti cubiero con dos capas de CS+CVR

Se omite la fabricación de tres capas debido a que los resultados comparativos con recubrimientos de dos capas son muy parecidos.

Para preparar las muestras y se puedan observar con el SEM, se pulverizan previamente con la composición Platino-Paladio con una proporción 80-20 respectivamente. Se genera una fina capa, de 5-50 nm, lo suficiente para dar propiedades conductivas a la superficie.



**Imagen 25.** Pantalla del SEM, donde se observa el interior del microscopio con los discos dentro

### 5.5.3 Caracterización de la rugosidad y espesor de la superficie

En este apartado se observará y determinará la rugosidad de las superficies de diferentes muestras, así como también el espesor de las capas mediante el Interferómetro de luz blanca. Para determinar el espesor se medirá el escalón que se forma al cortar la mitad del recubrimiento y extraerlo. Es decir, una de las caras de cada disco de Ti, tendrá solo la mitad del recubrimiento, la otra mitad será retirada. Se preparan para analizar las siguientes muestras:

- Disco de Ti cubiero con una capa de CS
- Disco de Ti cubiero con una capa de CS+DOX
- Disco de Ti cubiero con dos capas de CS+DOX
- Disco de Ti cubiero con una capa de CS+CVR

- Disco de Ti cubiero con dos capas de CS+CVR

#### 5.5.4 Determinación de las propiedades mecánicas de la superficie

Con este ensayo se pretende determinar el agarre que existe entre el recubrimiento y la superficie del Ti. Se observará si existen diferencias al formar un recubrimiento con multicapas. Las condiciones que se analizarán son muestras con una, dos y tres capas para DOX y CRV.

Con el adhesivo de cianocrilato se pegaran las piezas por un lado, al disco de soporte y por otro lado, a una mordaza. Se irá aplicando fuerza de tracción a la mordaza de forma que al final el recubrimiento se desprenda del Titanio.



Imagen 26. Mordazas

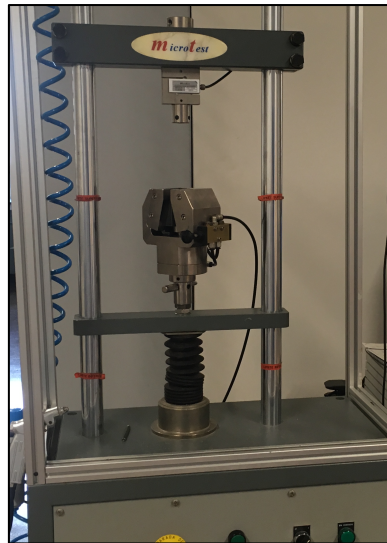


Imagen 27. Equipo usado para el ensayo de tracción. MicroTEST (con una capacidad de 20T)

### 5.6 Ensayo de inhibición bacteriana

A continuación se muestran los pasos que se deben seguir para la realización del ensayo bacteriano:

- **Preparación del medio:**  
El medio se prepara según indicación del fabricante. Se prepara en envase de 100ml. Se pesa la cantidad necesaria y se llena hasta el volumen final con agua destilada. El medio se lleva al autoclave. Después de esterilizar, y una vez se ha enfriado, el medio se guarda en la nevera.
- **Preparación del inóculo:**
  1. Descongelamos el eppendorf de la bacteria con el que tenemos que trabajar.
  2. De mientras, preparamos a la campana un halcón de 15ml que rellenamos con 10 ml del medio.
  3. Añadimos 50µl de bacterias al medio que hemos añadido al falcon. Identificamos el falcon y lo guardamos en el incubador durante 24h.

- **Preparación de las placas de agar:**

Cada 20 placas, necesitamos 500ml de medio.

1. Preparación de medio con agar: se mezcla la cantidad de medio necesaria (según medio) y 15g/l de agar, y rellenamos con agua destilada hasta volumen final.
2. Se lleva la botella al autoclave.
3. Se saca la botella del autoclave y sin que termine de enfriar llenan las placas dentro de la Se saca la botella del autoclave y sin que termine de enfriar llenan las placas dentro de la campana. Placas enfrían sin tapa puestas con pirámide.
4. Cuando el agar se ha enfriado, se vuelven a guardar las placas en la nevera.

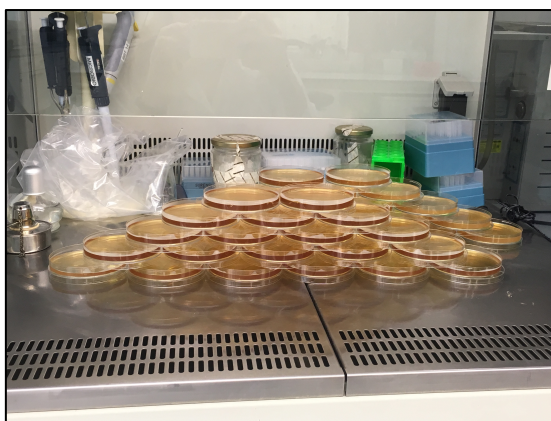
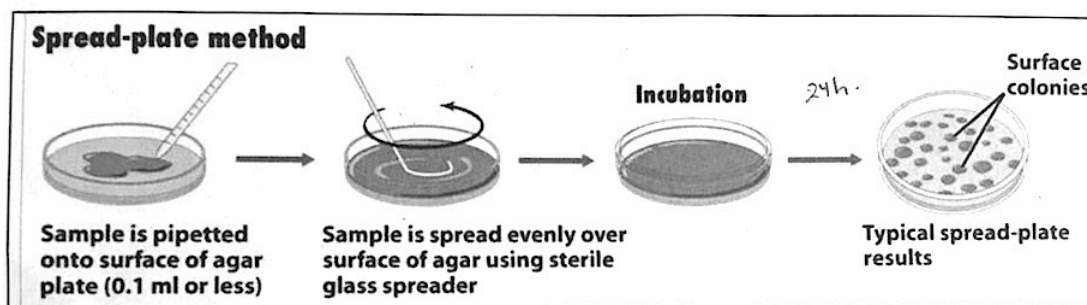


Imagen 28. Preparación de las placas

- **Ensayo de difusión en agar**

1. Se ajusta el inóculo a 0.2 de absorbancia. Por ello se añade 1 ml del inóculo preparado el día anterior en 10 ml del medio, en un falcon de 15ml. Llevamos la mezcla en el vórtice y se pipetea 1ml para medir la absorbancia. (Antes de hacer la medida en el espectrofotómetro, ajustamos el 0 con una cubeta con medio.
2. Una vez ajustado el inóculo, sembramos 100µl sobre la capa de agar.
3. Quemamos la varilla de vidrio y la enfriamos rascando sobre la parte interior de la tapa de la placa de Petri.
4. Repartir el inóculo sembrado con la varilla haciendo círculos, sin acercarse a las paredes de la placa de Petri. Agujereamos el agar para colocar los discos de titanio.
5. Guardamos las placas en la incubadora.





## 5.7 Ensayo de adhesión celular

Siguiendo los protocolos que tiene el laboratorio, a continuación se muestran los pasos que se deben seguir para la realización del ensayo de adhesión celular:

Protocolo de adhesión:

- Tripsinizar las células en 2 ml de TrypLE (Invitrogen) y visualizar como se despegan.
- Añadir 3 ml de medio completo al flask y pasar los 5 ml totales a un falcon de 15 ml.
- -Añadir 5 ml de medio nuevo en el flask, mezclar y añadirlos a los 5 ml del falcon.
- Centrifugar a 300 g durante 5 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pelet en un volumen adecuado para contar las células.
- Poner 10 ul a la cámara de Neubauer y contar las células.
- A partir de la concentración obtenida, diluir las células para tener el número de células que se quiere sembrar en el volumen de medio que se quiere utilizar.
- Sembrar las células en las muestras.
- Preparar una recta patrón con un número de células creciendo: 0, 10.000, 20.000, 40.000 y 80.000.
- Dejar durante 4-6h (depende del tipo celular) en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.
- Aspirar el medio y lisar las células en un volumen de tampón M-PER (Thermo Fisher) que cubra las muestras (generalmente 300 ul).
- Dejar unos 5 min y realizar ensayo de LDH o congelar hasta hacerlo.

Protocolo LDH<sup>18</sup>:

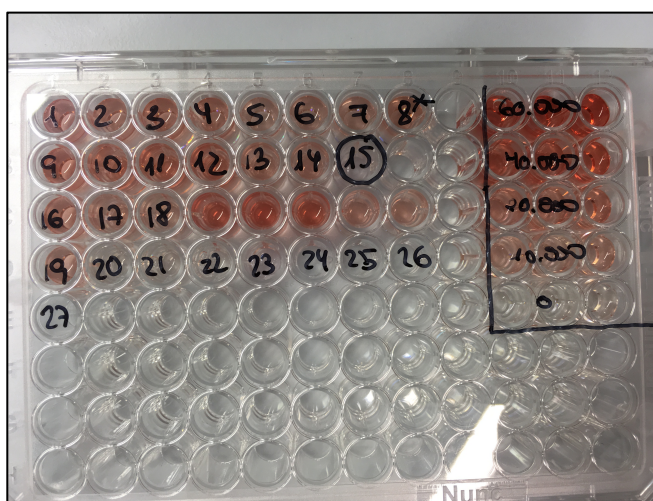
- La medida del número de células se realiza mediante el kit Cytotoxicity Detection Kit LDHPLUS de Roche Applied Sciences, siguiendo sus especificaciones.
- Se deben dejar descongelando las muestras hasta que estén a temperatura ambiente, ya que es una reacción enzimática, a menos temperatura más lenta irá.
- Se utiliza 100 ul de cada muestra. En la proliferación, se debe tener en cuenta que las células duplican cada 2 días aproximadamente, empezando a contar a partir del día 1. Se deben hacer las diluciones correspondientes en M-PER para que el número de células esté dentro de la recta patrón.

---

<sup>18</sup> El LDH es una enzima catalizadora. Se usa este protocolo porque gracias a este enzima, cataliza la unión del reactivo 2 (reactivo que da color) con una de las proteínas de las células, de forma que podemos cuantificar el numero de células.



- Cada reacción se mezclará con 100 ul de la mezcla de reacción. Esta mezcla se prepara a partir de los reactivos 1 y 2 del kit. Se pondrá 12:25 ml de reactivo 1 y 11.25 ml de reactivo 2 por cada 100 reacciones.
- Se deja incubando durante unos 10 min a temperatura ambiente, observando el cambio de coloración de amarillo a rojo. Se debe visualizar bien diferenciados los puntos de la recta de calibración, sin que se saturen los puntos con más células.
- Se para la reacción con 50 ul de la solución de STOP (puerta HCl, que cambia el pH desnaturalizando las enzimas).
- Se lee la absorbancia a 492nm en un espectrofotómetro (Synergy HTX, Bio-Tek).
- Realizar una recta de dispersión para obtener la fórmula (de tipo  $Y = AX-B$ ) para extrapolar la absorbancia de las muestras y obtener el número de células.



**Imagen 30.** Placa diferentes muestras mas las muestras para la recta de calibración

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Ensayo de liberación de los principios activos

A continuación se detallan los resultados obtenidos del ensayo cinético con el Microplate.

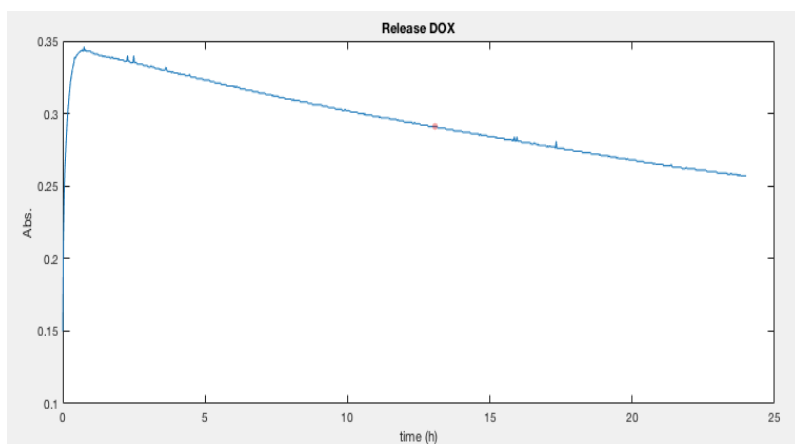
#### 6.1.1 Liberación de la doxicilina

Se analiza el estudio de la liberación de doxicilina en las tres condiciones mencionadas:

- Con un solo recubrimiento
- Con dos capas de recubrimiento
- Con tres capas de recubrimiento

##### 6.1.1.1 Resultados con el microplate

Una vez realizada la cinética de 24 horas, se observa que los resultados obtenidos no son los esperados, ya que a partir de un momento en concreto se observa que la gráfica va en decrecimiento. La siguiente figura es el resultado de una de las muestras, que ejemplifica el comportamiento de todas las muestras y de cómo varía la absorción en función de las horas.



**Figura 5.** Cinética de DOX durante 24h medida con el microplate

Este comportamiento es debido a que la doxicilina es muy sensible tanto a la luz como a la temperatura por lo que, al estar durante 24h en un ambiente hostil, provoca que esta se degrade y por tanto que varíe el punto de absorción. Comprobamos que muestras a concentración constante, el valor de absorción (que debería ser fijo) varía con el tiempo.

### 6.1.1.2 Aplicación matemática

Como ya se ha mencionado, dada una concentración de doxiciclina conocida e invariable, al estudiar como evoluciona en función del tiempo, se observa como esta no se mantiene constante, tal y como cabría esperar. En la Figura 6 se muestra dicha degradación.

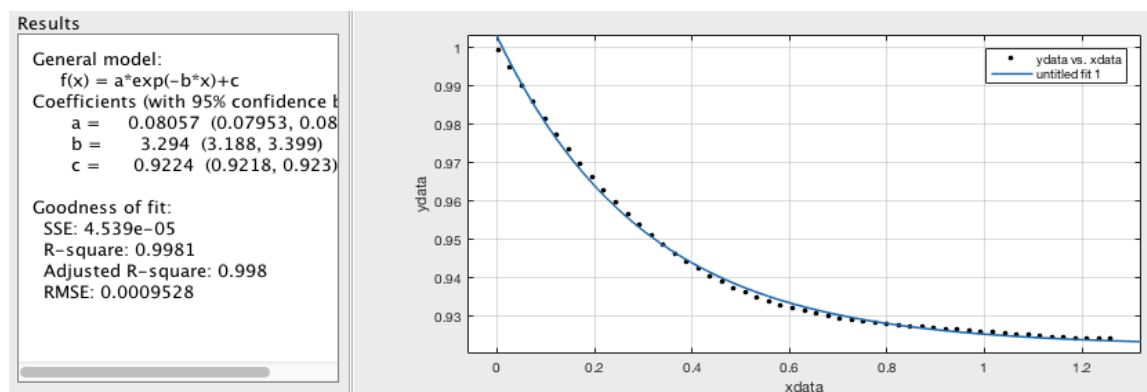


Figura 6. Degradación de la DOX con el tiempo

Utilizando el programa Matlab, se puede aproximar esta curva como una función exponencial. De esta forma, suponiendo que el valor ideal de absorbancia durante todo el tiempo debe ser 1 para la concentración estudiada, se puede conocer la diferencia que hay desde el valor real al valor ideal, y añadir esta diferencia a los primeros resultados encontrados.

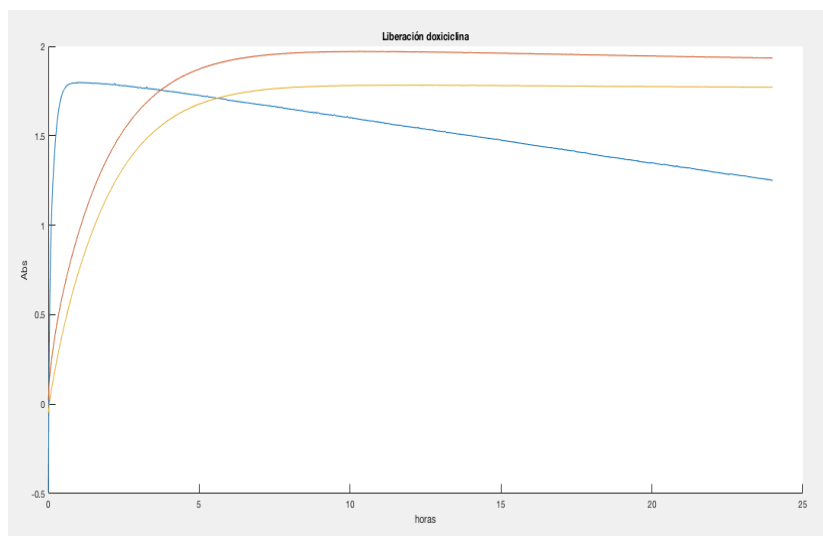
Con éste método conseguimos encontrar unas curvas de liberación más lógicas, y con la recta de calibración que ya se ha mostrado en el capítulo anterior, se puede encontrar cuanta concentración va liberando la capa a medida que transcurre el tiempo y también se puede analizar en función de la cantidad absoluta.

Todo el procedimiento usado para la obtención de los resultados de este apartado, se encuentran en el Apéndice A1.

### 6.1.1.3 Resultados finales

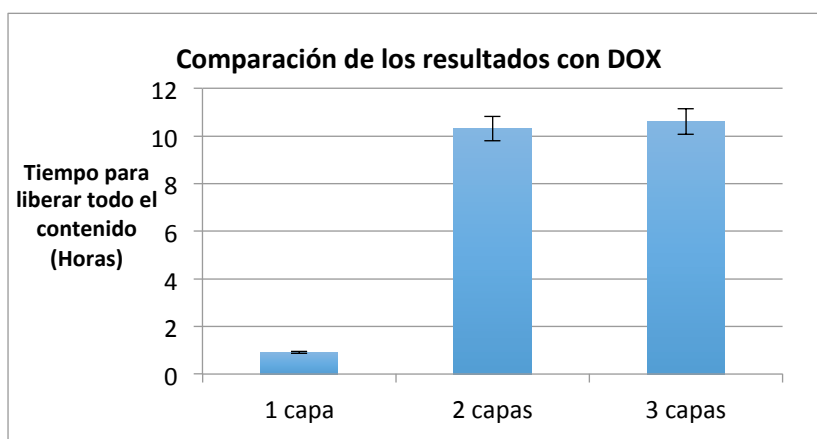
Finalmente, después de todo el procedimiento descrito, llegamos a obtener, mediante un método bastante robusto, una comparación entre las diferentes condiciones para la doxiciclina.

La Figura 7 muestra la el promedio de los valores encontrados. Cada una de las gráficas representa la liberación de doxiciclina con una, dos y tres capas de recubrimiento.



**Figura 7.** Liberación de la doxiciclina con una capa (gráfica azul), con dos capas (gráfica naranja) y con tres capas (gráfica amarilla)

Para hacer un análisis en detalle, se observa, para cada pieza, cuanto tiempo tarda en conseguir liberar todo el contenido, este momento será cuando las medidas de absorbancia se mantengan estables con el tiempo, es decir, que no sigan creciendo. El valor máximo de absorbancia que nos va a dar cada muestra variará función de la cantidad de sustrato que tenga la pieza, pero cuando llegue un punto en el momento de la cinética en que el valor de absorbancia deje de crecer, significará que la muestra ha liberado el 100% del contenido. El instante cuando el valor de absorbancia pasa a ser constante, marca el tiempo que tarda una muestra en liberar todo el contenido.



**Figura 8.** Comparación de los resultados obtenidos con las diferentes capas cargadas con DOX

Como se puede observar, el hecho de sobreponer una nueva capa de CS encima de la capa cargada con doxiciclina hace un efecto barrera y por tanto, el tiempo que tarda el material en desprenderse de todo el principio activo es mucho mayor. Entre la primera y segunda capa se observa una gran diferencia, con dos capas, es aproximadamente 10 veces mas lento que con una sola capa. Sin embargo, la diferencia entre dos y tres capas no es significativa, mas bien, no hay diferencias, por lo

que se puede entender que el efecto no es aditivo, la suma de mas de una capa haciendo barrera no ralentiza de forma proporcional (no es 10 veces mayor).

Para ver los resultados de todas las gráficas obtenidas, ir al Apéndice A1.

### 6.1.2 Liberación del carvacrol

Se analiza el estudio de la liberación de carvacrol en las tres condiciones mencionadas:

- Con un solo recubrimiento
- Con dos capas de recubrimiento
- Con tres capas de recubrimiento

#### 6.1.2.1 Resultados con el microplate

Por otro lado, se realiza el mismo proceso de cinética de 24 horas pero ahora utilizando CRV. Se observa que los resultados obtenidos tampoco son los que se esperarían; igual que con la doxiciclina, partir de un momento en concreto se observa que la gráfica va en decrecimiento. La siguiente figura es el resultado de una de las muestras, que ejemplifica el comportamiento que tiene el carvacrol en a lo largo del tiempo.

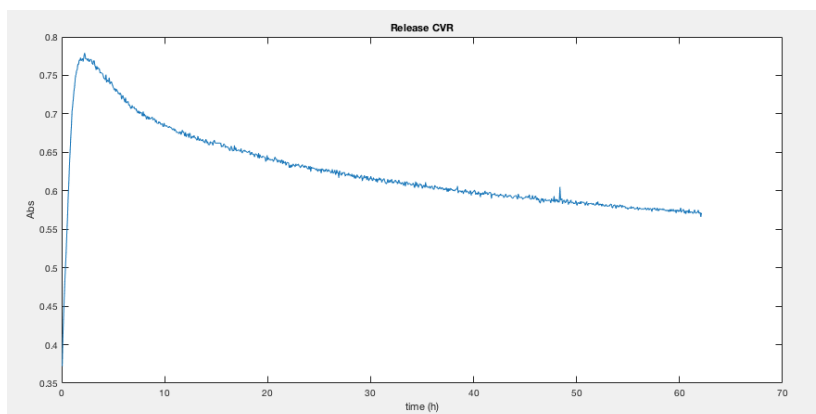


Figura 9. Cinética de CVR durante 24h medida con el microplate

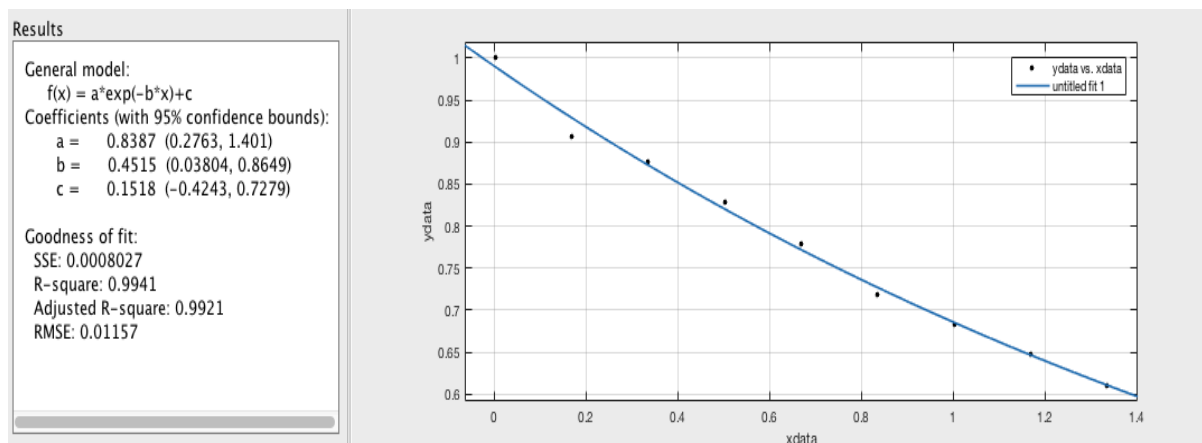
Este comportamiento se debe a la hidrofobia del carvacrol. El medio con el que se diluye es una solución acuosa por lo que no facilita mucho la liberación de carvacrol al medio. Por otro lado, debido a la formación de micelas y a su comportamiento, lo mas probable es que la medición no se esté realizando a una solución homogénea; las micelas se van quedando mas adheridas a las paredes, y en la lectura, todas estas partículas no se tienen en cuenta.

Esta teoría es comprobada con el sonicador, donde se ha observado que, usando soluciones con concentraciones conocidas, después de haber transcurrido unas horas, al sonicar las diferentes

soluciones, vuelven a ser mezclas más homogéneas y cuando se vuelve a realizar una lectura, obtenemos los resultados que habíamos en un inicio.

#### 6.1.2.2 Aplicación matemática

Teniendo en cuenta que una concentración conocida, en un proceso de cinética, debería tener siempre el mismo valor de absorbancia. Se realiza una prueba para comprobar como varia la absorbancia en realidad, según las causas mencionadas.



**Figura 10.** Degradación del CRV con el tiempo, para una concentración conocida

Se puede pensar que sonicando las muestras de forma continua no se decaerá la curva de absorción, pero, se debe aclarar que se trata de un estudio de cinética continuo, que no se puede interrumpir para llevar al equipo de ultrasonidos y luego continuar otra vez con el Microplate; si se hiciera así, se perdería mucha información. Utilizando el programa Matlab, se puede aproximar esta curva como una función exponencial. Y de la misma forma que se pretende analizar la Doxiciclina, se sigue el mismo procedimiento con el Carvacrol. La diferencia que hay entre el valor ideal y el valor real va creciendo a medida que transcurre el tiempo, y esta diferencia creciente es añadida a los primeros resultados obtenidos con el Microplate.

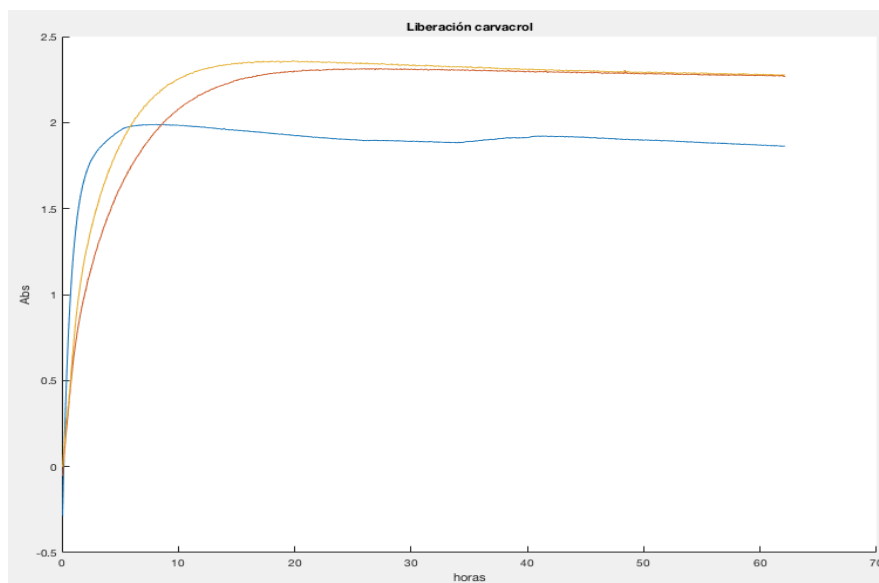
Con éste método conseguimos encontrar unas curvas de liberación más lógicas, y como ya se ha hecho la recta de calibración, mostrada en el capítulo anterior, se puede encontrar cuanto concentración va liberando la capa a medida que transcurre el tiempo y también se puede analizar en función de la cantidad absoluta.

Todo el procedimiento usado para la obtención de los resultados de este apartado, se encuentran en el Apéndice A2.

### 6.1.2.3 Resultados finales

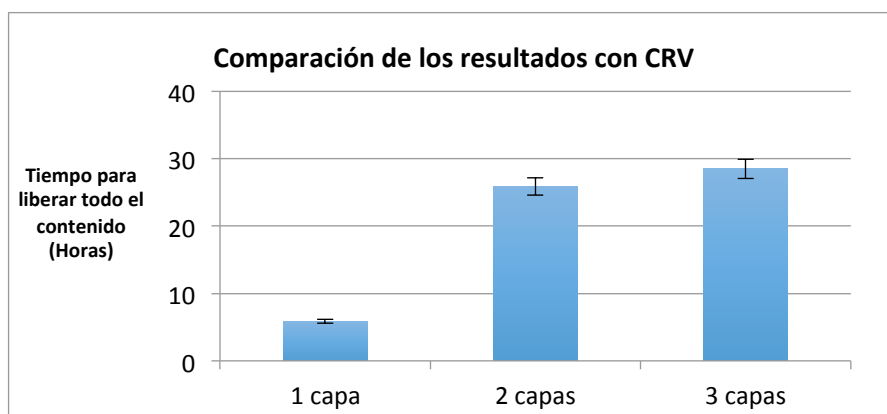
Una vez realizado todo el procedimiento descrito, se obtiene, mediante un método bastante robusto, una comparación entre las diferentes condiciones para el carvacrol.

La Figura 11 pretende ser un resumen de los resultados finales encontrados. Muestra una comparación entre la facilidad y rapidez de liberación de carvacrol con una, dos y tres capas.



**Figura 11.** Liberación de carvacrol con una capa (gráfica azul), con dos capas (gráfica naranja) y con tres capas (gráfica amarilla)

A continuación se presenta una grafica de barras para observar numéricamente las diferencias entre las tres condiciones. Para comparar los diferentes resultados y observar si existe un aumento del retraso de liberación usando los recubrimientos como barreras, se compararan los tiempos en los que se alcanza el valor máximo de liberación, es decir, ya no tienen mas principio que liberar.



**Figura 12.** Comparación de los resultados obtenidos con las diferentes capas cargadas con CRV

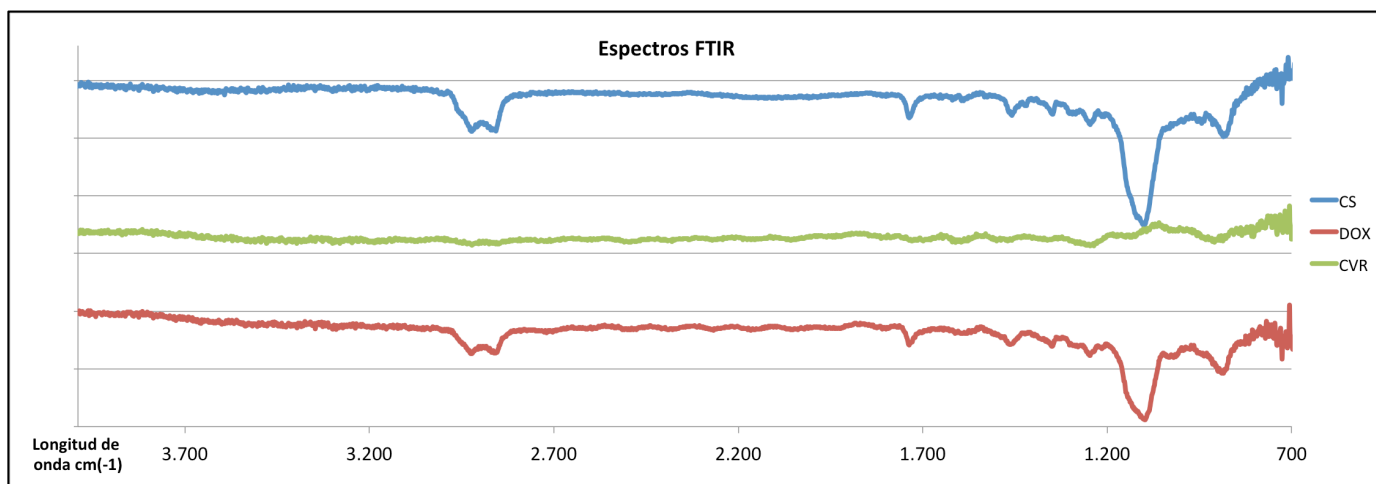
Con los resultados obtenidos, se comprueba que el hecho de sobreponer una nueva capa de CS encima de la capa cargada con carvacrol hace un efecto barrera lo que implica que con esta segunda capa, el material tarda mas en desprenderse de todo el principio activo. Entre la primera y segunda capa se observa una gran diferencia; con dos capas, el proceso es aproximadamente 5 veces mas lento que con una sola capa. Sin embargo, la diferencia entre dos y tres capas no es significativa, mas bien, no hay diferencias, no es comparable a la relación entre las muestras con una y dos capas.

Para ver los resultados de todas las gráficas obtenidas, ir al Apéndice A2.

## 6.2 Caracterización del recubrimiento

### 6.2.1 Caracterización del Quitosano, la Doxyciclina y el Carvacrol

A continuación se procede a analizar el espectro IR obtenido, analizando muestras con recubrimientos de CS, CS+DOS, CS+CRV. El espectro que se obtiene es la transmitancia (%) en función de la longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Para determinar la presencia de los diferentes compuestos, se analizarán si existen los picos específicos de cada molécula, según sus enlaces.



**Figura 13.** Espectros con Infrarrojo de quitosano (gráfica azul), Carvacrol (gráfica verde) y Doxyciclina (gráfica roja)

Enlaces característicos de la molécula de Quitosano:

- $3400 \text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace N-H.
- $2920 \text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace C-H.
- $1650 \text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace C=C.
- $1500 \text{ cm}^{-1}$ , corresponde a la presencia del grupo carboxilo C=O.
- $1051 \text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace O-H.



#### Enlaces característicos de la molécula de Doxiciclina

- $3430\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace N-H
- $1215\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace C-N
- $1621\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al doble enlace C=N
- $1384\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al grupo  $\text{CH}_2$

#### Enlaces característicos de la molécula de Carvacrol

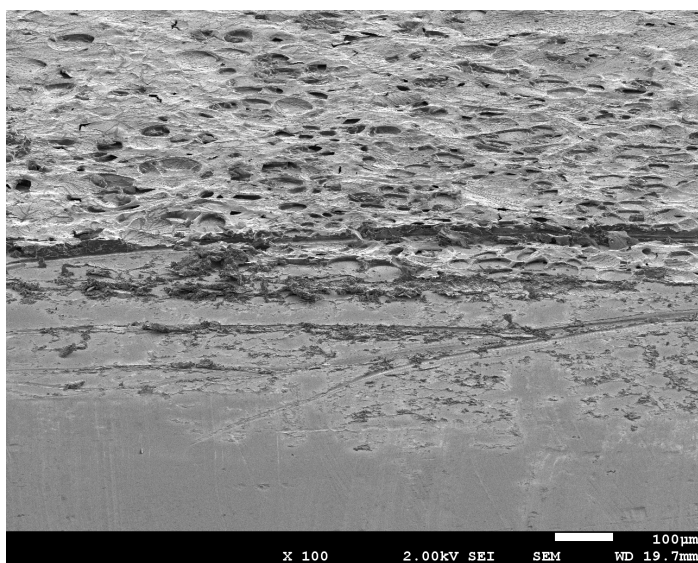
- $3066\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al doble enlace  $=\text{C-H}$
- $3201\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace con el grupo -OH
- $1622\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace C=C.
- $1091\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace C=C.

Se pueden observar en la gráfica los distintos picos que determinan la presencia de los tres elementos. Como la capa de carvacrol es muy fina, no hay tanta resolución de este componente, de todas formas, se pueden distinguir ciertos picos. En los tres espectros se observa la presencia de quitosano, sobretodo en el pico  $1051\text{ cm}^{-1}$  y el pico  $2920\text{ cm}^{-1}$  (los dos picos más pronunciados)

### 6.2.2 Caracterización del acabado superficial

Con el microscopio electrónico de barrido se ha estudiado la caracterización superficial, así como también la observación de la presencia de las distintas capas. A continuación se muestra para cada una de las condiciones, los resultados obtenidos.

- **Recubrimiento con una capa de quitosano:**



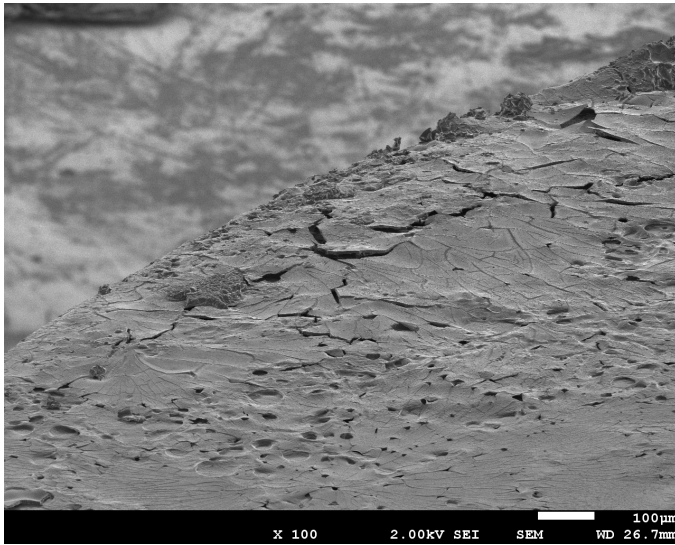
**Imagen 31.** Recubrimiento de Ti con una capa de quitosano

Tal y como se muestran estas imágenes, ya se ve a simple vista que el acabado superficial no es el idóneo, presenta una estructura muy porosa e irregular, no tiene un acabado liso e homogéneo.

Con la función de electrones retrodispersantes podemos saber la cantidad de elementos que hay en la muestra.

Además la cantidad de sustancia no es igual en toda la capa, por un lado el espesor es más fino que en otro.

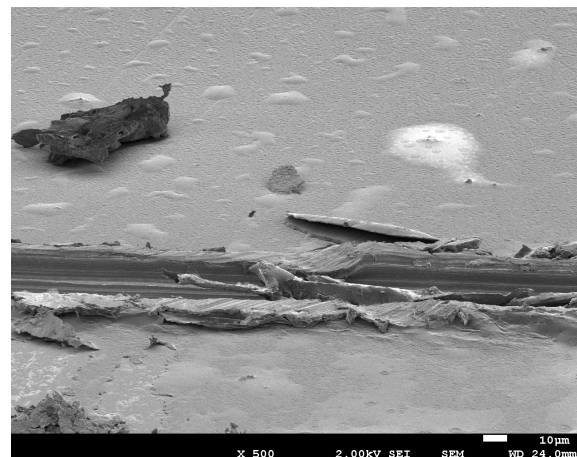
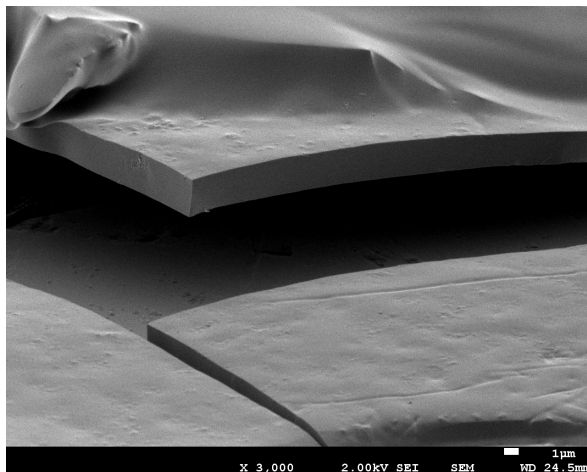
### - Recubrimiento con una capa de quitosano + carvacrol:



**Imagen 32.** Recubrimiento de Ti con una capa de quitosano + carvacrol

Añadiendo carvacrol en la solución de quitosano, se puede observar como afecta significativamente al comportamiento de la capa. Aparentemente, esta capa es mas homogénea, no se observan tantas porosidades a simple vista pero, en cambio, es mucho mas fina y en ciertos puntos, analizando con electrones retrodispersantes, se observa que la cantidad de material del recubrimiento es mínima, solo se distingue Ti, es casi como si no hubiera recubrimiento.

### - Recubrimiento con dos capas de quitosano + carvacrol:



**Imagen 33 y 34.** Recubrimiento de Ti con dos capas de quitosano + carvacrol

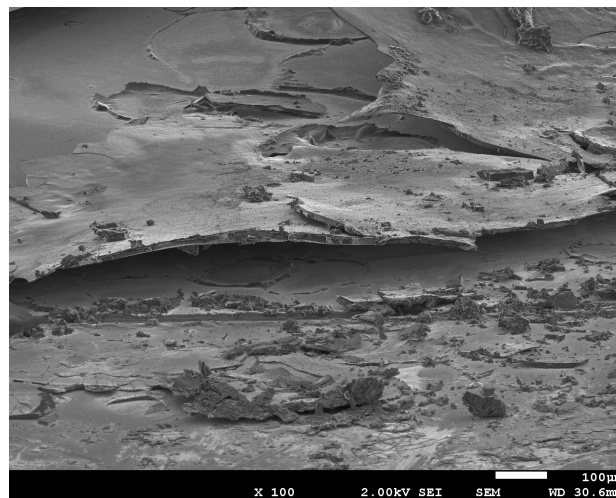
Se observa que aquí si se puede determinar el grosor de una de las capas que observamos que se ha levantado de la superficie al formarse una grieta. La característica de esta capa, así como también la anterior, son las dos extremadamente finas, tal y como se puede observar en las imágenes con retrodispersantes del Apéndice A.2.

También cabe mencionar que el acabado superficial es mejor que las anteriores, al colocar la segunda capa de quitosano, se acaban de rellenar espacios y completar las irregularidades o porosidades que pudiera haber, por lo que la capa es aun mas homogénea.

- **Recubrimiento con una capa de quitosano + doxiciclina:**

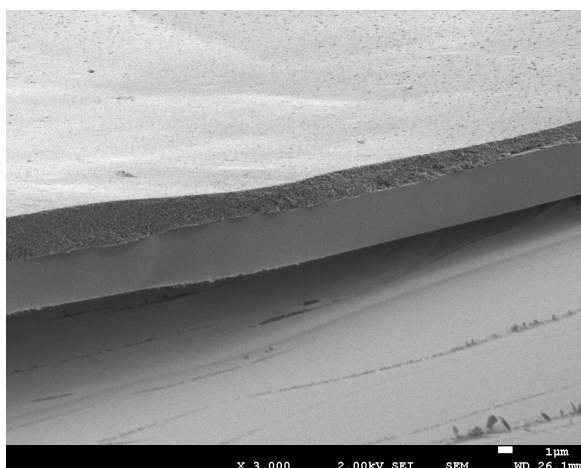
La característica de este recubrimiento es que a simple vista está mas agrietada, parece que sea más frágil y que por eso se formen estas estrías. Se puede ver claramente el espesor de dicha capa con la imagen que acompaña.

Al contrario, que con el carvacrol, el espesor de la capa es mucho mayor.



**Imagen 35.** Recubrimiento de Ti con una capa de quitosano + doxiciclina

- **Recubrimiento con dos capas de quitosano + doxiciclina:**



**Imagen 36.** Recubrimiento de Ti con dos capas de quitosano + doxiciclina

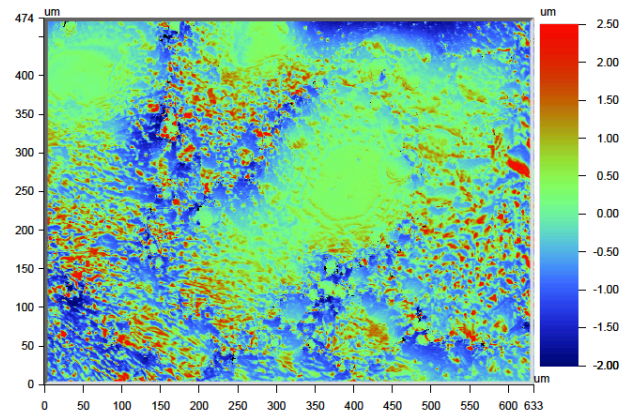
Es la condición con un mejor acabado superficial, no presenta prácticamente irregularidades, es una capa completamente homogénea. Además, se pueden ver claramente las dos capas y la diferencia que hay entre ellas. La capa mas interna tiene un aspecto más denso, y tal y como se observa en otras imágenes que salen en el Apéndice, el tipo de fractura que tiene es de un material más frágil. En cambio, la capa mas externa, de solo quitosano, tiene un aspecto mas poroso, pero aun así, mas uniforme que en la primera condición , que también era de una sola capa de quitosano.

*Para ver todas las imágenes que se han realizado con el SEM, para cada una de las condiciones analizadas, están todas en el Apéndice B.1.*

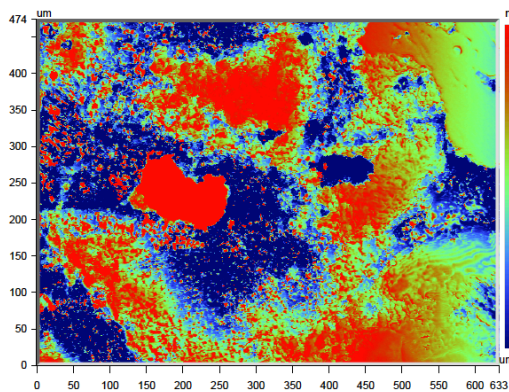


### 6.2.3 Caracterización de la rugosidad y espesor de la superficie (inter)

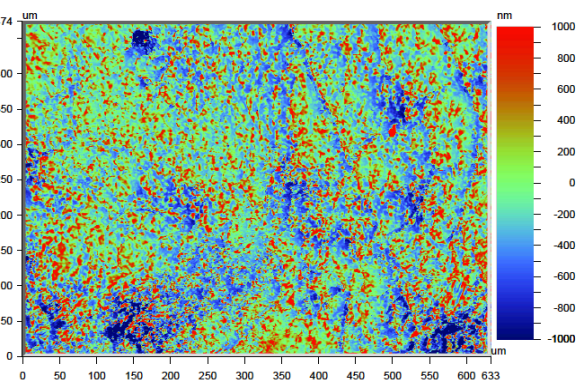
Con el equipo de interferometría nos da una idea de cómo es la rugosidad de la superficie en 3D. A continuación se analiza la rugosidad de las distintas superficies.



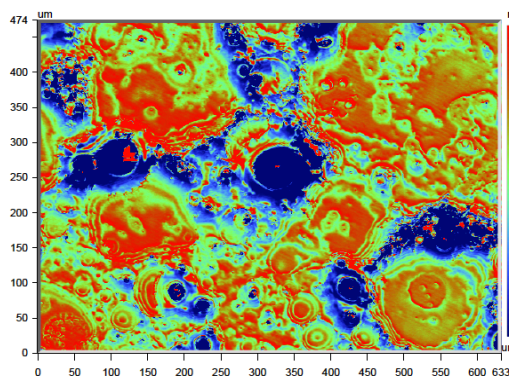
**Imagen 37** Una capa de quitosano



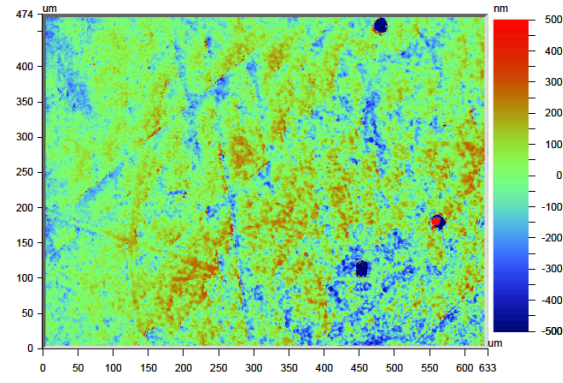
**Imagen 38** Una capa de quitosano+DOX



**Imagen 39** Dos capas de quitosano+DOX



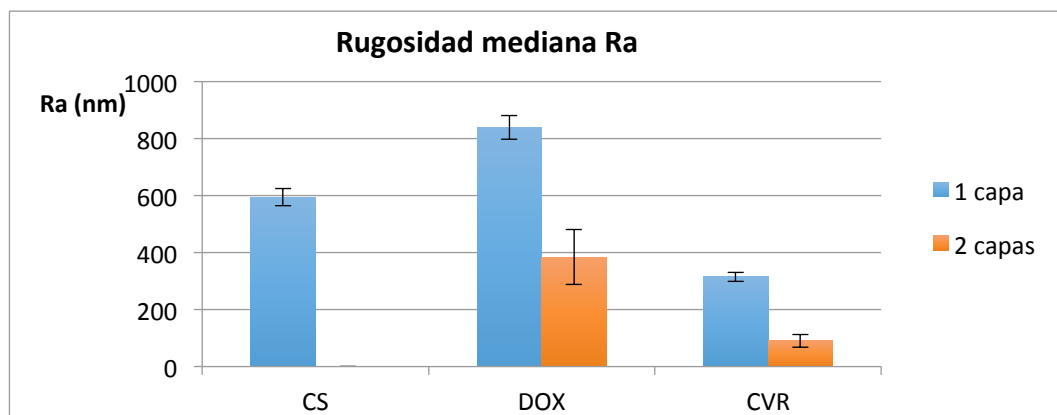
**Imagen 40** Una capa de quitosano+CVR



**Imagen 41** Dos capas de quitosano+CVR

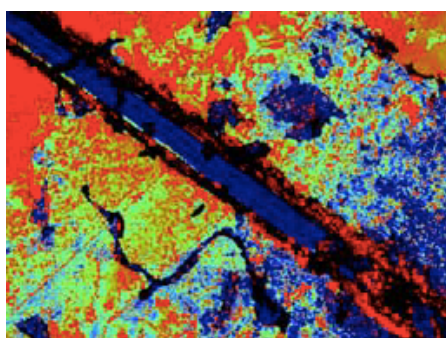
Solamente observando las imágenes ya podemos deducir que las superficies de una sola capa presentan mas rugosidades que las de dos capas, ya que como se ha mencionado en el apartado anterior, al poner la segunda capa estas corrigiendo las posibles irregularidades que pueda haber en la primera. De todas maneras, con el equipo se mide el  $R_a$ , la rugosidad media de la superficie, para

cada una de las imágenes. A continuación se presenta una gráfica con los valores de  $R_a$  medidos por el quipo.



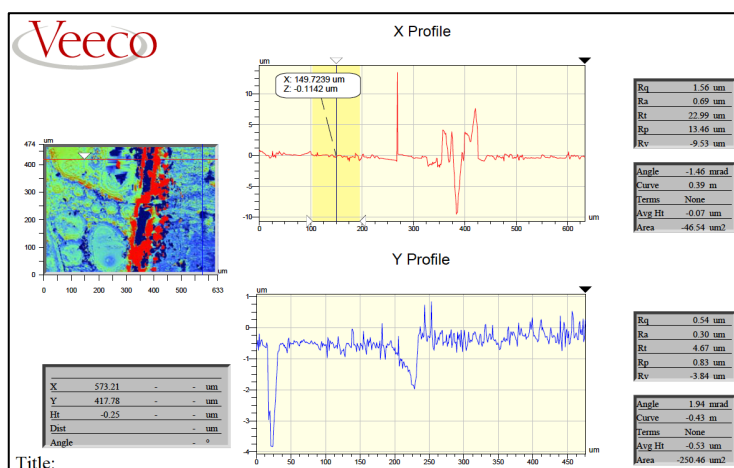
**Figura 14.** Estudio de la Rugosidad mediante Interferometría

Como se esperaba, al colocar la segunda capa, reduce significativamente la rugosidad de la primera capa. Por otro lado, así como parecía en escala de  $\mu\text{m}$  con el SEM que la cobertura de DOX era mas homogénea y sin menos irregularidades; a nivel nm se ha comprobado que es todo lo contrario, quien forma una capa más regular es el carvacrol. También es razonable que sea así dado que al ser unan capa mucho mas delgada, no permite tanto error conformidad.

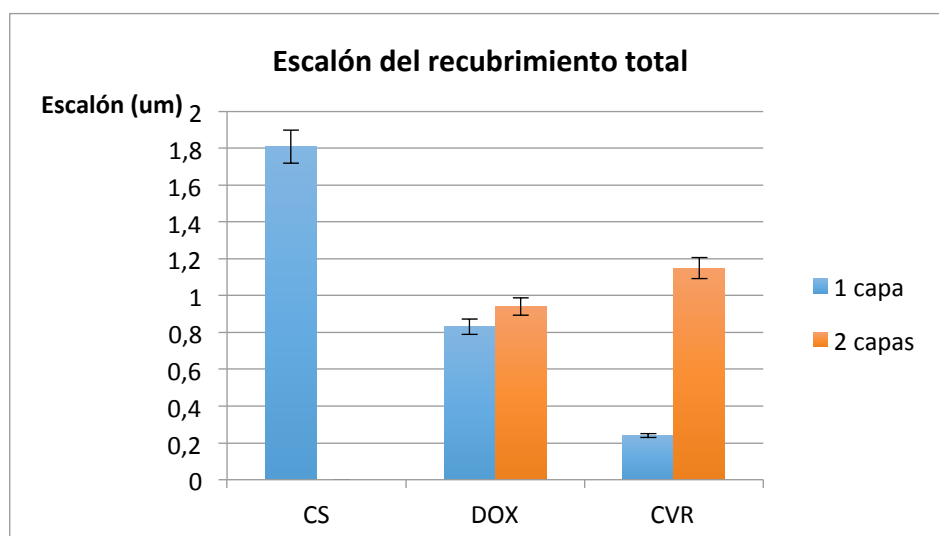


**Imagen 41.** Corte de una de las coberturas

Por otro lado, se realizan unos cortes transversales sobre los discos de titanio para retirar la mitad de la cobertura y poder calcular el espesor de la capa, calculado el escalón que se forma. Se realizan diferentes medidas para cada una de las condiciones y se acaba encontrando los siguientes resultados:



**Imagen 42.** Pantalla del interferómetro, con el que se obtienen las medidas de espesor



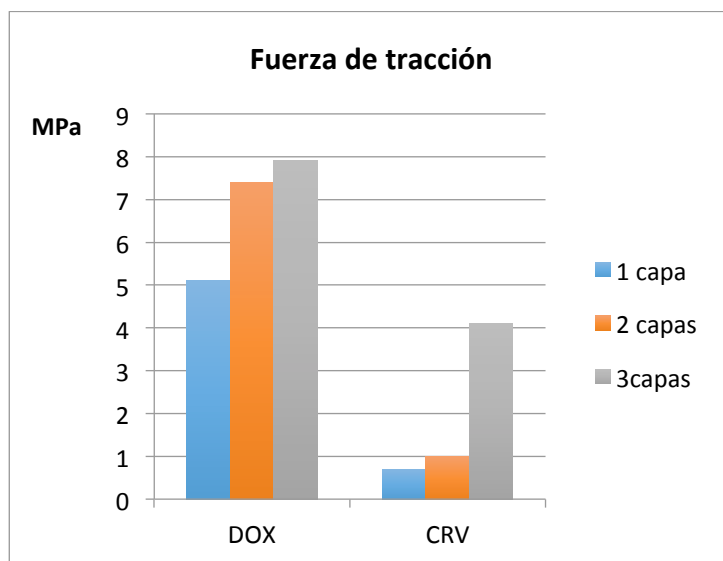
**Figura 15.** Estudio del espesor mediante Interferometría

A partir de estos datos, lo que se puede observar es que la capa mas gruesa es la que esta hecha solo de quitosano, lo que significa que al añadir otros componentes, disminuye la concentración de quitosano, que es lo que verdaderamente da volumen al recubrimiento. Cuando se compara entre el recubrimiento de una capa y el de dos capas, no hay mucha concordancia entre los resultados. Si que es verdad que al añadir, una segunda capa, el espesor debe aumentar respecto a la primer, es algo obvio; pero, la proporción que entre la primera y la segunda capa de DOX no tiene que ver con la proporción que mantienen las de CVR.

La única explicación plausible delante de este hecho, es que en el proceso de cubrimiento de una capa de carvacrol haya habido algún factor no controlado que ha hecho cometer algún error en el proceso, y por ello, no se ha llegado a cubrir bien la superficie.

#### 6.2.4 Determinación de las propiedades mecánicas de la superficie

Para el ensayo de tracción se estudian todas las condiciones propuestas en un inicio. Se observa cual es la fuerza necesaria para arrancar la capa de la superficie del titanio, y de aquí podemos analizar la adherencia de los films de quitosano sin ningún tratamiento adicional de mejora de adhesión.



**Figura 16.** Estudio del espesor mediante Interferometría

Con los resultados obtenidos, se puede entender que cuantas mas capas formen el recubrimiento, lo que, con los resultados obtenidos implica menor rugosidad y mayor espesor, se necesitará mas fuerza de tracción para arrancar el recubrimiento al completo.

Por otro lado, se ven diferencias entre las soluciones con DOX y CRV, lo que implica que, dependiendo del principio activo que incluyas en la solución de quitosano, las propiedades del film final variaran. En este caso se observa como se necesita mucho menos fuerza para arrancar los recubrimientos de carvacrol; este suceso es en parte motivado por el espesor de la capa, es decir, como ya se ha mencionado en los otros ensayos, el recubrimiento con una solución de CRV es mucho mas delgada.

### 6.3 Ensayo de inhibición bacteriana

Para el estudio del efecto de inhibición bacteriana de los dos principios activos estudiados, se analizará el efecto antibacteriano al cabo de 24h y de 48h. Para realizar este ensayo, a las 24h se trasladaran las mismas piezas a unas nuevas placas de agar recién sembradas, para ver si mantienen el efecto transcurridas otras 24h.

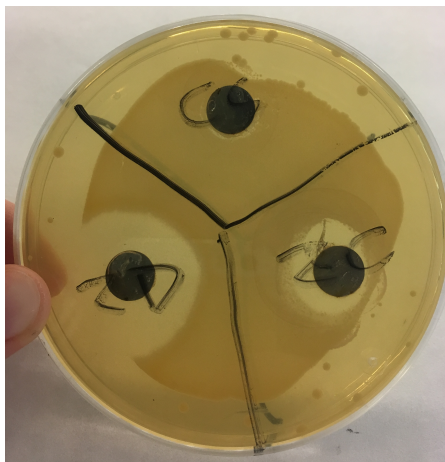
El análisis de este efecto se hará mediante la medida longitudinal, el diámetro, del halo de inhibición. Las condiciones que se medirán son las siguientes:

- recubrimiento de una capa de quitosano como control.
- recubrimiento de una capa de quitosano + DOX
- recubrimiento de dos capas de quitosano + DOX
- recubrimiento de una capa de quitosano + DOX

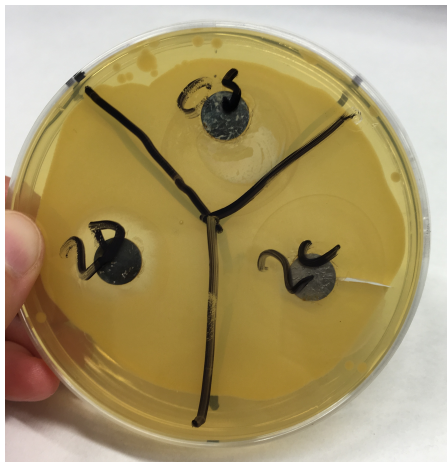


- recubrimiento de dos capas de quitosano + DOX

Los resultados encontrados han sido los siguientes:

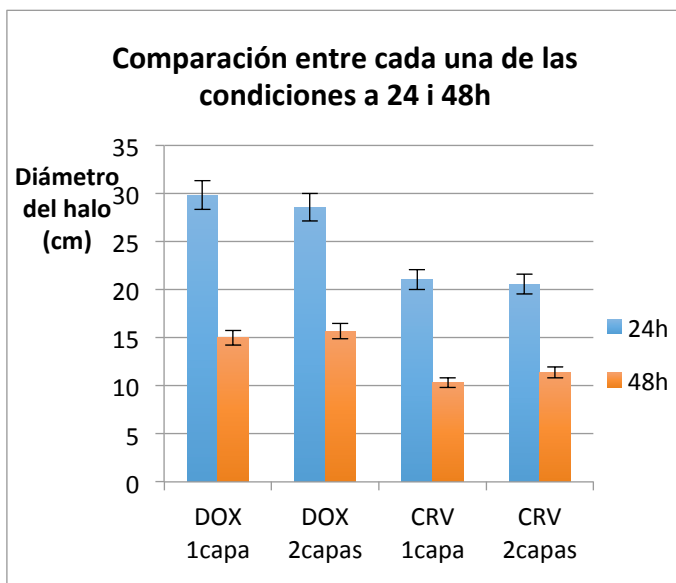


**Imagen 43.** Efecto de inhibición a las 24h

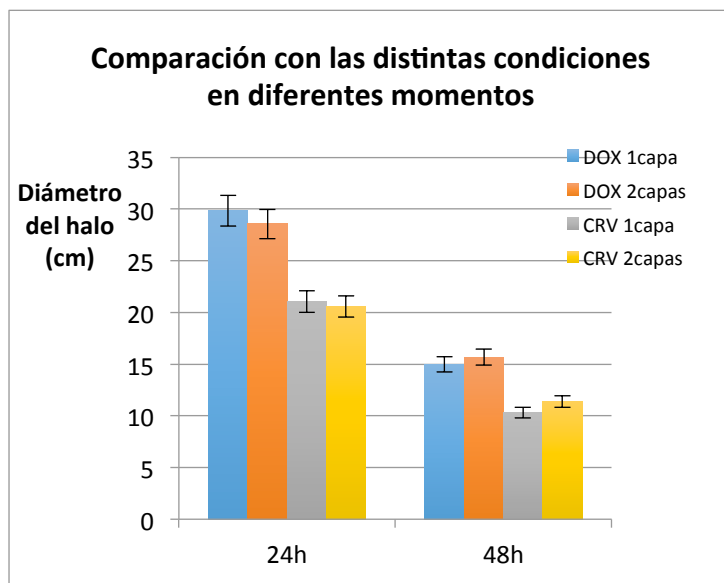


**Imagen 44.** Efecto de inhibición a las 48h

Visualmente ya se puede observar que el halo disminuye, y que, por otro lado, el quitosano que usamos no tiene ningún efecto bacteriostático.



**Figura 17.** Evolución del halo en 24 y 48h para las diferentes condiciones



**Figura 18.** Comparación del efecto entre las diferentes condiciones

Con la primera gráfica se puede analizar, la cada condición, si pasadas las 24h de efecto, todavía hay algún tipo de remanente o por el contrario, ha perdido toda efectividad posible (ya ha liberado todo el contenido de principio activo en las primeras 24h). Por otro lado, visualmente, para comparar si existen diferencias pasadas 24h comparando las diferentes condiciones, se observa mejor desde la segunda gráfica.



A pesar de todo, los valores no son muy significativos, las diferencias entre las diferentes condiciones son muy pequeñas. Para confirmar si se trata de un ensayo con resultados positivos o con resultados negativos se realiza un análisis estadístico de variancia. (anexado en el Apéndice ).

Según los resultados obtenidos con un análisis ANOVA, ha dado que tan solo se ven diferencias significativas entre los valores de carvacrol de una y dos capas en el estudio de 24h. Esto quiere decir que todos los resultados con doxiciclina se consideran sin diferencias, por lo que no se puede mostrar que hayan diferencias en el proceso de liberación de los discos. Además, con este ensayo, no se puede relacionar muy bien con el ensayo de liberación dado que las piezas se encuentran en medios distintos, A pesar de que están a la misma temperatura, en el estudio de liberación, las muestras estaban en un medio acuoso, por tanto es mas fácil la liberación. Aunque en el ensayo de bacterias, las muestras se incrustan en el agar y les rodea un cierto grado de humedad, no tienen la misma facilidad para descargar el principio activo.

## 6.4 Ensayo de adhesión celular

Primeramente se realiza la recta de calibración, para saber cuantas células han quedado adheridas a nuestras piezas.

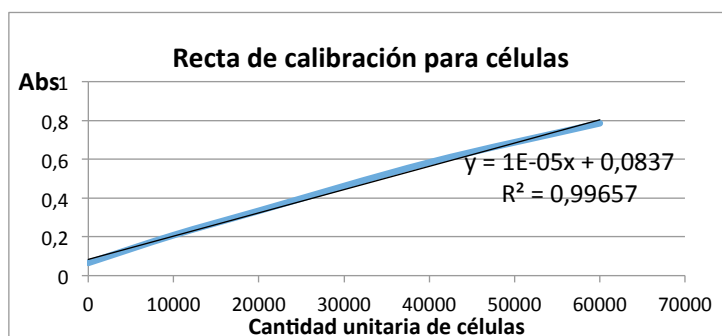


Figura 19. Recta de calibración relacionando absorción en función de cantidad de células

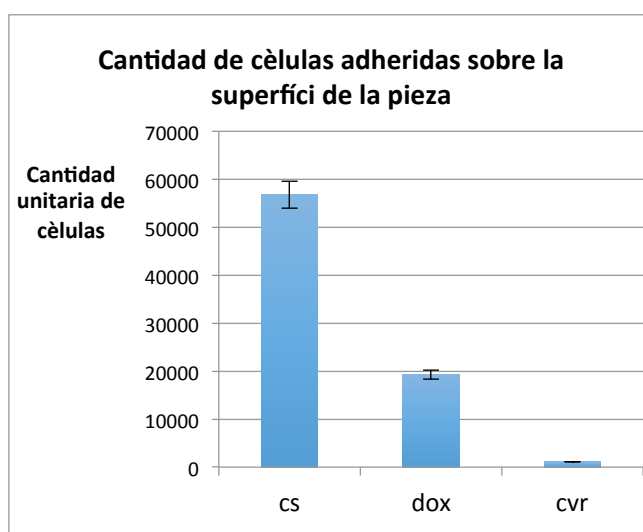


Figura 20. Análisis comparativo de adhesión entre las diferentes condiciones de estudio

Con los resultados encontrados se puede hacer una estimación de la biocompatibilidad de la superficie, así como también determinar si se nota un cierto grado de toxicidad. Para este análisis se ha decidido utilizar las condiciones de:

- recubrimiento con una capa de quitosano.
- recubrimiento con una capa de quitosano+doxiciclina.
- recubrimiento con una capa de quitosano+carvacrol.

Se han seleccionado estas piezas ya que son las más críticas, son las que liberan el principio activo más rápido, y por tanto, en caso de dar algún resultado negativo, estas muestras lo harán antes.

Tal y como se observa en la Figura 20, con las muestras de quitosano, prácticamente todas las células se adhieren a la superficie (casi el 100%), lo que quiere decir que es muy biocompatible y que probablemente no habrá ningún problema de citotoxicidad.

Seguidamente, si observamos los resultados de la doxiciclina, se adhiere aproximadamente el 30% de las células que inicialmente se han colocado sobre la superficie. No es una muy buena respuesta, pero podría ser debido al cambio de propiedades superficiales de la capa, ya que, como se ha analizado en ensayos anteriores, tanto la rugosidad como el espesor son distintos y puede que con doxiciclina no sea una superficie tan atractiva para las células.

Finalmente, los resultados con carvacrol son bastante desalentadores. La adhesión de células sobre la superficie es prácticamente nula. A banda de las propiedades superficiales, que, como ya hemos mencionado con la doxiciclina, pueden tener cierto efecto; el gran inconveniente del recubrimiento con carvacrol es el hecho de necesitar Tween80 para mezclarse. El Tween 80 es un surfactante, es decir, en cierto modo actúa como un jabón; los surfactantes tienen la capacidad de romper la bicapa lipídica de la membrana celular, provocando la lisis de las células. En conclusión, las células no se pueden adherir porque la propia superficie las mata, cabe esperar que este tipo de recubrimientos tampoco pasen ensayos de toxicidad.

## 7. Análisis del impacto ambiental

---

El impacto ambiental se debe tener en cuenta en todo momento, dado que se están trabajando con productos químicos, que tienen sus mayor o menor grado de toxicidad y peligrosidad. Para intentar reducir el impacto ambiental, entre otras cosas, se debe tener muy presente la limpieza, la organización y la gestión de residuos.

La gestión de residuos dentro del laboratorio de be ser clasificada según el origen de cada producto químico, y así se les puede asignar un tipo de contenedor u otro para su almacenaje. Un ejemplo es el proceso de limpieza de las piezas de titanio, donde durante el proceso se utilizan diferentes disolventes orgánicos. Se debe tener cuidado con las cantidades que se gastan, pero además esta todo organizado de forma que todo estos residuos de disolventes orgánicos vayan en un mismo contenedor de productos no-halogenados. Si los recipientes ya están 3/4 partes llenos, se reservan en armarios, hasta que empresas específicas, como es el caso de ECOCAT, vienen a buscar los recipientes que están llenos. Hay empresas que se dedican a la gestión y posterior tratado de residuos peligrosos.

Por otro lado, cuando se utilizan las campanas de bacterias o de cultivos, todos los materiales y residuos que se van gastando, se tiran en un contenedor especial que cuando se llenan, al ser material sensible, se llevan los residuos en bolsas a esterilizar para luego poderlas tirar.

Según los residuos que se desechan, hay unas normas establecidas que indican en que envase deben ir:

- Residuos ácidos: envase de PP con capacidad de ó litro de residuos.
- Residuos básicos: envase de PP con capacidad de ó litro de residuos.
- Residuos sólidos con mercurio: envase de PP con capacidad de 10 litros y boca ancha.
- Agua con mercurio: envase de PP con capacidad de ó litro de residuos.
- Residuos sólidos sin mercurio: envase de PP con capacidad de 10 litros y boca ancha.
- Residuos sólidos metálicos: envase de PP con capacidad de ó litro de residuos.
- Residuos sólidos: envase de PP con capacidad de 5 litros y boca ancha.
- Disolventes: envase de PP con capacidad de 10 litros de residuos.



## Conclusiones

---

Para realizar unas conclusiones mas detalladas de este estudio, separaremos el redactado en los cuatro puntos clave en los que se basan este Proyecto:

### 1. Recubrimiento multicapa

Se ha llevado a cabo la correcta realización de una solución de Quitosano que permita un trabajado fácil y sencillo y sin presentar ningún tipo de dificultad para incluir principios activos a la solución.

Se ha implementado un nuevo sistema de Dip-Coating con el que se realizan recubrimientos de Titanio con una, dos o tres capas. La característica que tienen las tres condiciones es que la capa mas interna siempre debe contener algún principio activo. Para el proceso de fabricación de cada capa dura 24h ya que se hace el secado a temperatura ambiente. Al probar de acortar el proceso, colocando las piezas en una estufa a 37°C, el acabado no era igual, quedaba un poco quemado.

### 2. Control de liberación de principios activos

Se puede concluir que sí se puede controlar el proceso de liberación de principios activos mediante difusión. Se ha determinado un método con el cual se puede estudiar la facilidad de las muestras para liberar el activo.

Se ha comprobado como, mediante la superposición de capas, estas actúan como barrera impidiendo que las moléculas que contienen, sean liberadas al medio con tanta rapidez. A pesar de que no se observan diferencias significativas entre colocar como barrera, una o dos capas; la diferencia entre colocar una barrera de una capa y no colocarla hace que el comportamiento de liberación varíe bastante ya que se llega a conseguir desacelerar 10 veces más el proceso de liberación.

### 3. Caracterización de la superficie

La adición de principios activos en la solución del film, hacen que el acabado superficial no sea el más esperado. La superficie no queda completamente homogénea sobre de la pieza de Titanio. Parece que al añadir dichas sustancias, el film pierde ductilidad, tiene mayor facilidad para agrietarse y pierde adhesión con la superficie del titanio. Los ensayos mecánicos muestran que se necesita la aplicación de muy poca fuerza para arrancar el recubrimiento.

Tampoco la superposición de una capa sobre otra no aumenta como se esperaría lo que hace suponer que quizá el secado de las capas no es completo y que por tanto los estratos del film no pueden aumentar.

#### 4. Propiedades biológicas

Con el ensayo bacteriológico no hemos podido llegar a ninguna conclusión satisfactoria ya que con la realización del análisis estadístico, se ha comprobado que aquellas mínimas diferencias que podían apuntar maneras, se ha visto que no son realmente diferencias significativas a tener en cuenta. Por lo que se concluye que la actividad antibacterial durante 48h, es la misma tanto si hay una doble capa como si no la hay. Esto puede deberse a que el film de quitosano no está envuelto de una solución acuosa, si no que mas bien, se encuentra en un ambiente con humedad pero quizá no la suficiente como para que libere tan deprisa el medicamento.

Los ensayos de adhesión celular han mostrado que las soluciones de quitosano cargadas con algún material no son la mejor opción para que se adhieran las piezas. Una idea de mejora sería reducir la cantidad de principio activo y aumentar la proporción de solución de quitosano.

Además, con el estudio del carvacrol, se ha observado que con la utilización de Tween80 mueren muchas células, hace que aumente la citotoxicidad ya que, este surfactante deshace la capa bilipídica de la membrana celular.

## Presupuesto

Se muestra el desglose del presupuesto para este trabajo.

Material	Precio unitario	Cantidad	Coste
<b>Costes de materia prima</b>			
Barra de Titanio (1 m de longitudx10mm de diametro)	368,45€/ barra	0,2m	73,69 €
Quitosano en polvo MW	1324 €/kg	0,015kg	19,86 €
β-GP en polvo	33,3€/g	5g	166,50 €
Acido acético glacial	22,10 €/l	0,25l	5,53 €
Carvacrol	7,29 €/g	3 g	21,87 €
Tween 80	3,42€/l	3 g	10,26 €
Doxiciclina	55,5 €/g	0,75g	41,63 €

<b>Costes de la preparación de muestras de Ti</b>			
Embutidora LaboPress Struer	2,50 €/h	4h	10,00 €
Pulidora automática Rotopol-31	5,40 €/h	20h	108,00 €
Papel de silicio p1200	14,75 €/u	5u	73,75 €
Papel de silicio p2400	14,75€/u	5u	73,75 €
Papel de silicio p4000	17,90€/u	4u	71,60 €
Papel de Terciopelo	37,82 €/u	1u	37,82 €
Silica 0.06um	60,00 €/1 pote	1/2 pote	30,00 €

<b>Costes de limpieza de las muestras</b>			
Ciclohexano	50,30 €/L	0,5 l	251,50 €
Isopropanol	23,29 €/L	0,5 l	11,65 €
Etanol	25,50 €/L	1l	25,50 €
Acetona	16,65 €/L	1l	16,65 €

<b>Costes del Dip-Coating</b>			
Pinzas	0,95€/u	6u	5,70 €
Pesas	2,15€/u	4u	8,60 €
cordel	5,00€/100m	0,5m	0,00 €

<b>Equipos para la caracterización</b>			
--	--	--	--



Interferometro	6,00 €/h	1h	6,00 €
SEM	106,74€/h	3h	320,22 €
FTIR-ATR	5,14€/h	1h	5,14 €
Autoclave	30,00 €/h	1,5h	45,00 €
Horno	6,00 €/h	36h	216,00 €
MicroTest	67,00 €/h	0,5h	33,50 €
espectrofotometro	11,00€/h	96h	1.056,00 €

<b>Ensayo Bacteriologico</b>			
Medio	296,00 €/kg	0,182kg	53,87 €
Agar	1.116,00 €/kg	0,060 kg	66,96 €
PBS	1,56 €/unitat	5 u	7,80 €
Placas de Petri	0,18 €/unitat	40 u	7,20 €
Cubetas PMMA	0,06 €/unitat	15 u	0,90 €
Campana de cultivos	20,00 €/hora	3h	60,00 €

<b>Material de laboratorio</b>			
Puntas de pipeta	0,012 €/u	65 u	0,78 €
tubos falcons	0,85€/u	30 u	25,50 €
tubos eppendorf	0,012€/u	80 u	52,00 €

<b>Coste personal</b>			
Corte de muestras del taller			
mecánico	50,00 €/h	5 h	250,00 €
Pulido	20,00 €/h	40 h	800,00 €
Limpieza de muestras	20,00 €/h	6h	120,00 €
Preparación de soluciones	20,00 €/h	100 h	2.000,00 €
Proceso de recubrimiento	20,00 €/h	150 h	3.000,00 €
Estudio de liberación	20,00 €/h	60h	1.200,00 €
Espectrofotómetro	20,00 €/h	35h	700,00 €
FTIR	20,00 €/h	4h	80,00 €
Técnico SEM	100,00 €/h	3h	300,00 €
Interferometría	20,00 €/h	2h	40,00 €
Ensayo de tracción	20,00 €/h	2h	40,00 €
Ensayo bacteriano	20,00 €/h	4h	80,00 €
Ensayo de adhesión celular	20,00 €/h	4h	80,00 €



Otros			
Búsqueda bibliográfica	20,00 €/h	45h	900,00 €
Elaboración de la memoria	20,00 €/h	180h	3.600,00 €
Costes indirectos			
Servicios (alquiler, agua, electricidad)	10% del total	total:16210,72	1621,072
Total			17.831,79 €
Total (con IVA 21%)			21.576,47 €



## Bibliografía

---

### **Bibliografía de referencia**

- [1] Julio J. Contreras y Miguel Sepúlveda. *The molecular basis of infections associated to orthopedic implants*. Revista Patogenia: Infectología al Día. Universidad de Chile-Instituto Traumatológico, Santiago de Chile. Rev Chilena Infectol 2014; 31 (3): 309-322.
- [2] Michael T. Madiganm John M. Martinko, Jack Parker. *Brock. Biología de los microorganismos*. Libro Décima Edición. Madrid 2004. Editorial Pearson Educación SA. ISBN: 84-205-3679-2.
- [3] Werner Zimmerli and Parham Sendi. Orthopaedic biofilm infections. APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica); 125: 353–364. Recibido 4 Mayo de 2016, aceptado 10 de Enero 2017 y publicado por John Wiley & Sons Ltd, DOI 10.1111/apm.12687.
- [4] Real Academia Española. *Diccionarios de la lengua española*. Disponible en: <http://www.rae.es>
- [5] Clínica Universidad de Navarra. *Diccionario médico*. Disponible en: [http://www.cun.es/es\\_EC/diccionario-medico/terminos/profilaxis-antibiotica](http://www.cun.es/es_EC/diccionario-medico/terminos/profilaxis-antibiotica)
- [6] Davide Campocciaa, Lucio Montanaro y Carla Renata Arciola. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. ELSEVIER: Biomaterials 34 (2013) 8533 – 8554,
- [7] Callister, William D. Jr. *Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los materiales*. Editorial Reverté S.A. 3ra edición. 1995.
- [8] F.J. Gil y J.A. Planell. Aplicaciones biomédicas del titanio y sus aleaciones. Biomecánica – Originales, 34-42. Departamento de Ciencia de los materiales e Ingeniería Metalúrgica. Universidad Politécnica de Cataluña, E.T.S Ingenieros Industriales de Barcelona.
- [9] F.J. Gil y J.A. Planell. *Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros*. Biomecánica, VII, 13 (73-78), 1999. C.R.E.B. Centre de Recerca d'Enginyeria Biomèdica. Dept. Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales de Barcelona. Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona.
- [10] Xuanyong Liu, Paul K. Chu, Chuanxian Ding. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering R 47 (2004) 49–121. Disponible online Enero 2005 en [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).
- [11] TRATERIBER. *Recubrimientos metálicos mediante PVD*. Aalberts Industries; Disponible en: <http://www.trateriber.es/pdf/PVD.pdf>
- [12] Joel D. Bumgardner , Robin Wiser , Patrick D. Gerard , Patrick Bergin , Betsy Chestnutt , Mark Marini , Victoria Ramsey , Steve H. Elder & Jerome A. Gilbert (2003). *Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 14:5, 423-438



- [13] Majeti N.V. Ravi Kumar. *A review of chitin and chitosan applications*. Elsevier; Reactive & Functional Polymers 46 (2000) 1–27, [www.elsevier.com/locate/react](http://www.elsevier.com/locate/react).
- [14] Dina Raafat and Hans-Georg Sahl. *Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey*. Microbial Biotechnology (2009) 2(2), 186–201. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x. The Authors Journal compilation - Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd.
- [15] Jaepyoung Cho, Marie-Claude Heuzey, André Bégin, and Pierre J. Carreau. *Physical Gelation of Chitosan in the Presence of  $\beta$ -Glycerophosphate: The Effect of Temperature*. American Chemical Society, Biomacromolecules 2005, 6, 3267–3275. Publicado en web el 23/08/2005.
- [16] Inmaculada Aranaz, Marian Mengibar, Ruth Harris, Inés Paños, Beatriz Miralles, Niuris Acosta, Gemma Galed y Ángeles Heras. *Functional Characterization of Chitin and Chitosan*. Bentham Science Publishers Ltd. Current Chemical Biology, 2009, 3, 203–230.
- [17] Anna Gajda, Andre Posyniak y Katarzyna Pietruszka. *Analytical Procedure for the Determination of Doxycycline Residues in Animal Tissues by Liquid Chromatography*. Department of Pharmacology and Toxicology de Polonia; Bull Vet Inst Pulawy 52, 417–420, año 2008.
- [18] Ana Carolina Kogawa, Hérica Regina Nunes Salgado. *Doxycycline hyclate: a review of properties, applications and analytical methods*. International Journal of Life science & Pharma Research. Pagina 11–25. ISSN 2250-0480. Vol 2/Issue 4/Oct-Dec 2012
- [19] M. De Vincenzia, A. Stamatib, A. De Vincenzic, M. Silanoa. *Constituents of aromatic plants: carvacrol*. Elsevier: Fitoterapia 75 (2004) 801–804. [www.elsevier.com/locate/fitote](http://www.elsevier.com/locate/fitote)
- [20] Sara Burt. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review*. Elsevier: International Journal of Food Microbiology 94 (2004) 223–253. [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)
- [21] Mahmoud Alagawany, Mohamed Ezzat Abd El-Hack, Mayada Ragab Farag, Ruchi Tiwari, Kuldeep Dhama. *Biological Effects and Modes of Action of Carvacrol in Animal and Poultry Production and Health - A Review*. Open Access - Advances in Animal and Veterinary Science March 2015 | Volume 3 | Special issue 2 | Page 73 – 84. DOI:<http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.2s.73>. ISSN (Online) | 2307-8316; ISSN (Print) | 2309-3331
- [22] Shimadzu Corporation. *Manual de UV-3600 Spectrophotometer*. <http://www.shimadzu.com>
- [23] BioTek Instruments Inc. *GEN5 2.07 Secure User's Guide*. Marzo 2007, Revisión C.
- [24] Woodford, Chris. (2009/2016) Interferometers. Retrieved from <http://www.explainthatstuff.com/howinterferometerswork.html>. [Disponible]
- [25] Veeco Instruments Inc. *Wyko NT9800/9300 Surface Profiler – Setup and Operations Guide*. 2007
- [26] Bob Hafner. *Scanning Electron Microscopy Primer*. Characterization Facility, University of Minnesota-Twin

Cities 10/01/2015; 1-29

[27] Scai: Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación. *Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido*.; Disponible en: [http://www.scai.uma.es/servicios/area\\_microscopia/sem/sem.html](http://www.scai.uma.es/servicios/area_microscopia/sem/sem.html)

[28] Dimitri Ivanov, Nicolas Dubreuil, Vincent Raussens, Jean-Marie Ruyschaert, and Erik Goormaghtigh. *Evaluation of the Ordering of Membranes in Multilayer Stacks Built on an ATR-FTIR Germanium Crystal with Atomic Force Microscopy: The Case of the H1,K1-ATPase-containing Gastric Tubulovesicle Membranes*. Biophysical Journal, Volume 87 (2) 1307 – 1315, August 2004. DOI: 10.1529/biophysj.104.041863

[29] X. Pardell . *Apuntes de Electromedicina-Autoclave*. Disponible <http://www.pardell.es/autoclaves.html>

### **Bibliografía complementaria**

[1] Jacob T. Munro, Bassam A. Masri, Clive P. Duncan, Donald S. Garbuz. *High Complication Rate After Revision of Large-head - Metal-on-metal Total Hip Arthroplasty*. Clinica Orthopaedics Relates Research (2014) 472:523–528 . DOI 10.1007/s11999-013-2979-6

[3] Sebastien Ladet, Lauren David & Alan Domard. *Multi-membrane Hydrogels*. Nature Vol 452, March 2008 76-80. Nature Publishing Groupe. DOI: 10.1038/nature06619.

[4] Hee Don Han, Da Eu Nam, Dong Hoan Seo, Tae Woo Kim and Byung Cheol Shin. *Preparation and Biodegradation of Thermosensitive Chitosan Hydrogel as a function of pH and Temperature*. Macromolecular Research, Vol 12, No. 5, pp 507-511 (2004)

[5] Ming Kong, Xi Guang Chen, Ke Xing, Hyun Jin Park. *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. ELSEVIER: International Journal of Food Microbiology 144 (2010) 51–63. [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro). doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012

[6] Mohammad Ali Ghaz-Jahanian, Farzin Abbaspour-Aghdam, Navideh Anarjan, Aydin Berenjian, Hoda Jafarizadeh-Malmiri. *Application of Chitosan-Based Nanocarriers in Tumor-Targeted Drug Delivery*. Mol Biotechnol (2015) 57:201–218 DOI 10.1007/s12033-014-9816-3

[7] PanReac AppliChem ITW Reagents. *Specification Giemsa Stain A0909*. AppliChem GmbH

[8] Alberto Di Martino, Michael Sittinger, Makarand V. Risbud. *Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering*. ELSEVIER: Biomaterials 26 (2005) 5983–5990. [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials) ; doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.016

[9] Nathalia Valderrama Bohórquez, Néstor Ariel Algecira Enciso, William Albaracín Hernández. *Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero*. REVISTAMETERIA V.21 N.01, ISSN 1517-7076 artículo 11687, pp.141-156, 2016 doi:10.1590/S1517-707620160001.0013

[10] Sebastian Bauer, Patrik Schmuki, Klaus von der Mark, Jung Park. *Engineering biocompatible implant surfaces Part I: Materials and surfaces*. ELSEVIER Progress in Materials Science 58 (2013) 261–326.



[www.elsevier.com/locate/pmatsci](http://www.elsevier.com/locate/pmatsci). Doi:10.1016/j.pmatsci.2012.09.001

[11] Eugene Khora, Lee Yong Lim. *Implantable applications of chitin and chitosan*. ELSEVIER: Biomaterials 24 (2003) 2339–2349.

[www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials). doi:10.1016/S0142-9612(03)00026-7

[12] Raúl Gómez y Rogelio Murillo. *Espectroscopía Infrarroja*.

[13] Deepa Narayanan, R. Jayakumar and K. P. Chennazhi. *Versatile carboxymethyl chitin and chitosan nanomaterials: a review*. WIREs Nanomed Nanobiotechnol 2014, Volume 6: 574–598. 2014 Willey Periodicals Inc. doi: 10.1002/wnan.1301

## Apéndice A

### A1. Estudio en Matlab de la liberación de la Doxiciclina

```
function [newpza1, newpza2, newpza3, newpza4, newpza5, newpza6, newpza7,
newpza8, newpza9, tmedio_1c, tmedio_2c, tmedio_3c ] = unacapa( pza1, pza2,
pza3, pza4, pza5, pza6, pza7, pza8, pza9, time)
%UNTITLED5 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
[time]=time;
[y]= 0.08057*exp(-3.294*time)+0.9224;

[pza1]=pza1;
[pza2]=pza2;
[pza3]=pza3;
[pza4]=pza4;
[pza5]=pza5;
[pza6]=pza6;
[pza7]=pza7;
[pza8]=pza8;
[pza9]=pza9;

[newpza1]=pza1+(1-y);
[newpza2]=pza2+(1-y);
[newpza3]=pza3+(1-y);
[newpza4]=pza4+(1-y);
[newpza5]=pza5+(1-y);
[newpza6]=pza6+(1-y);
[newpza7]=pza7+(1-y);
[newpza8]=pza8+(1-y);
[newpza9]=pza9+(1-y);

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Una capa')
xlabel('horas')
ylabel('Abs')
plot(time, newpza1)
plot(time, newpza2)
plot(time, newpza3)
hold off

figure;
```

```

hold on
title('Liberación doxiciclina. Dos capas')
xlabel('horas')
ylabel('Abs')
plot(time, newpza4)
plot(time, newpza5)
plot(time, newpza6)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Tres capas')
xlabel('horas')
ylabel('Abs')
plot(time, newpza7)
plot(time, newpza8)
plot(time, newpza9)
hold off

%Recta de calibración
[c1]=(newpza1-0.0609)/0.1417;
[c2]=(newpza2-0.0609)/0.1417;
[c3]=(newpza3-0.0609)/0.1417;
[c4]=(newpza4-0.0609)/0.1417;
[c5]=(newpza5-0.0609)/0.1417;
[c6]=(newpza6-0.0609)/0.1417;
[c7]=(newpza7-0.0609)/0.1417;
[c8]=(newpza8-0.0609)/0.1417;
[c9]=(newpza9-0.0609)/0.1417;

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Una capa')
xlabel('horas')
ylabel('Concentración (%)')
plot(time, c1)
plot(time, c2)
plot(time, c3)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Dos capas')
xlabel('horas')
ylabel('Concentración (%)')

```



```
plot(time, c4)
plot(time, c5)
plot(time, c6)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Tres capas')
xlabel('horas')
ylabel('Concentración (%)')
plot(time, c7)
plot(time, c8)
plot(time, c9)
hold off

%Cantidad absoluta
[q1]=(c1/1.362)/100;
[q2]=(c2/1.432)/100;
[q3]=(c3/1.363)/100;
[q4]=(c4/1.372)/100;
[q5]=(c5/1.361)/100;
[q6]=(c6/1.348)/100;
[q7]=(c7/1.406)/100;
[q8]=(c8/1.354)/100;
[q9]=(c9/1.350)/100;

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Una capa')
xlabel('horas')
ylabel('Cantidad absoluta (mg)')
plot(time, q1)
plot(time, q2)
plot(time, q3)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Dos capas')
xlabel('horas')
ylabel('Cantidad absoluta (mg)')
plot(time, q4)
plot(time, q5)
plot(time, q6)
hold off
```

```

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Tres capas')
xlabel('horas')
ylabel('Cantidad absoluta (mg)')
plot(time, q7)
plot(time, q8)
plot(time, q9)
hold off

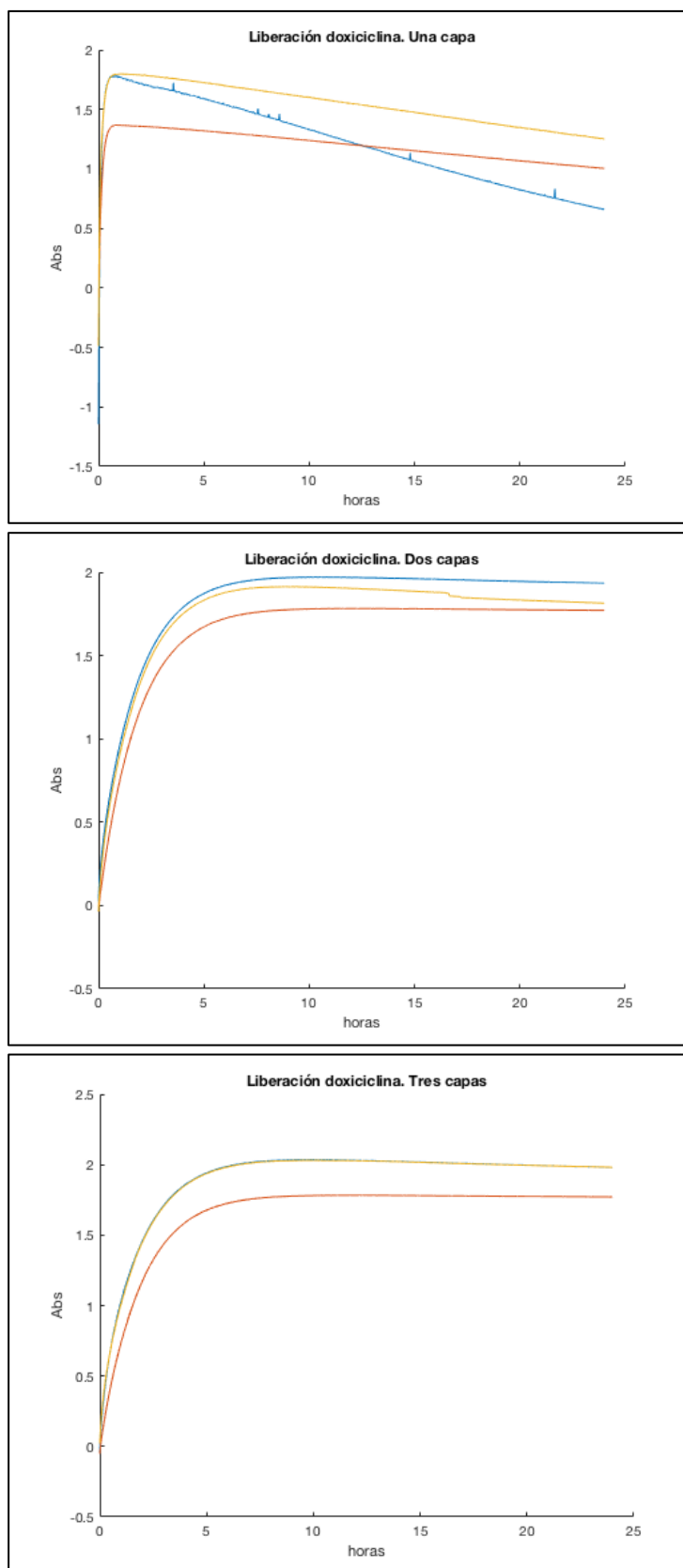
%calcular la constante de retraso
max1=max(c1);
pos1=find(c1==max1);
tmax1=time(pos1);
max2=max(c2);
pos2=find(c2==max2);
tmax2=time(pos2);
max3=max(c3);
pos3=find(c3==max3);
tmax3=time(pos3);
tmedio_1c=(tmax1+tmax2+tmax3)/3 %tiempo medio para una capa

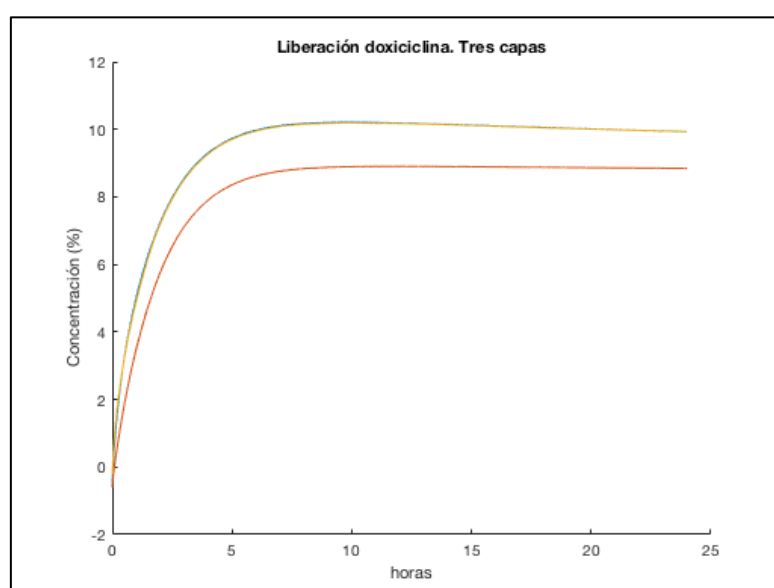
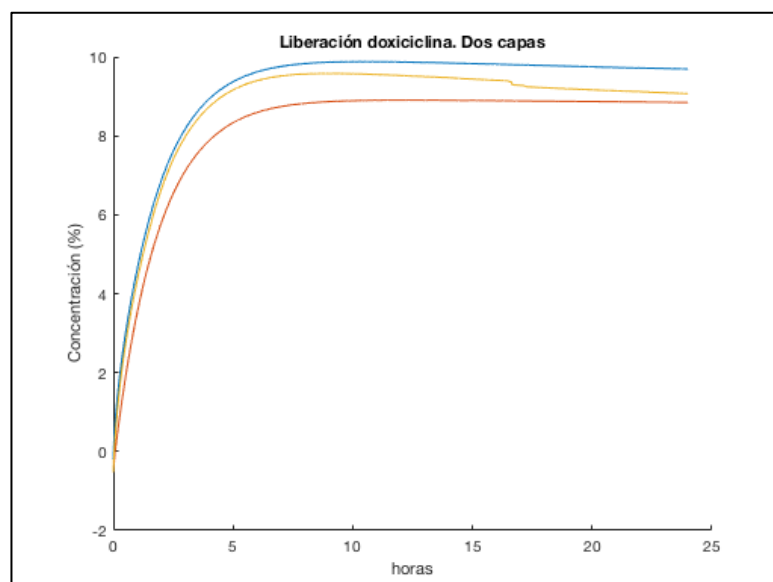
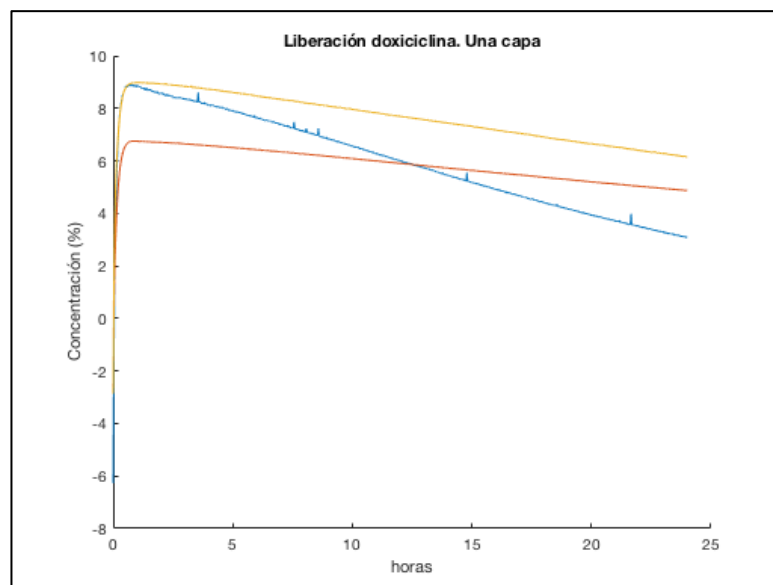
max4=max(c4);
pos4=find(c4==max4);
tmax4=time(pos4);
max5=max(c5);
pos5=find(c5==max5);
tmax5=time(pos5);
max6=max(c6);
pos6=find(c6==max6);
tmax6=time(pos6);
tmedio_2c=(tmax4+tmax5+tmax6)/3 %tiempo medio para dos capas

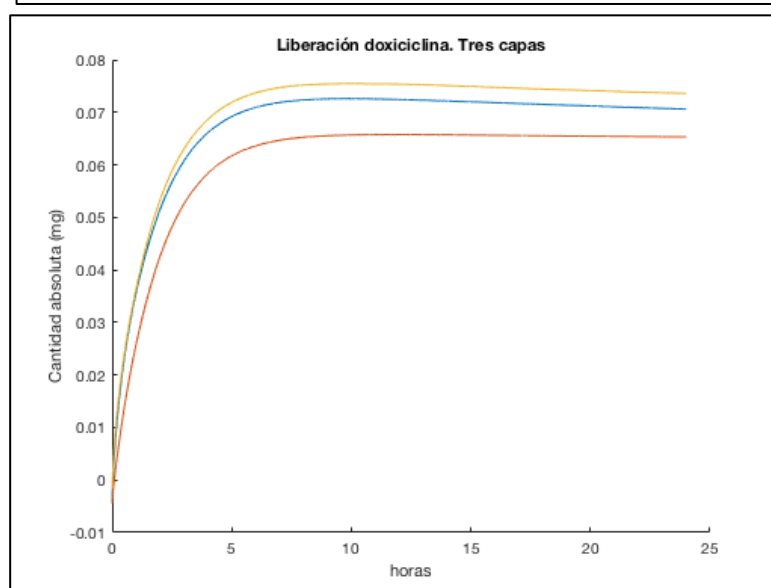
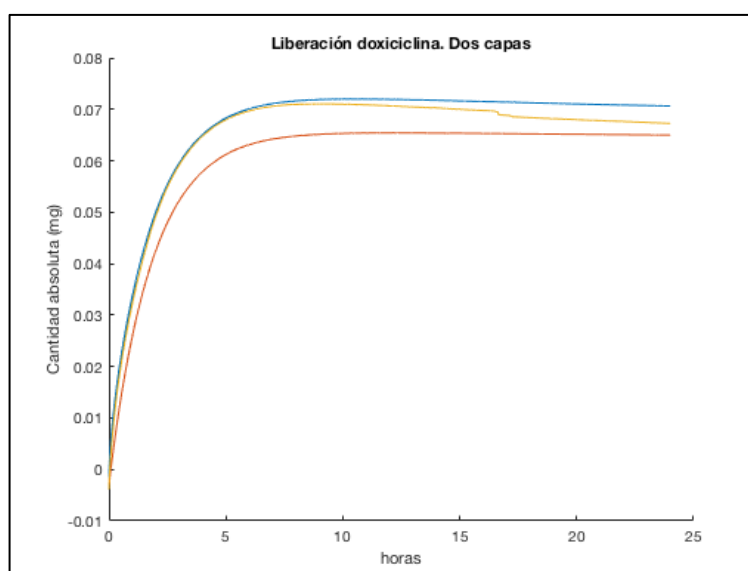
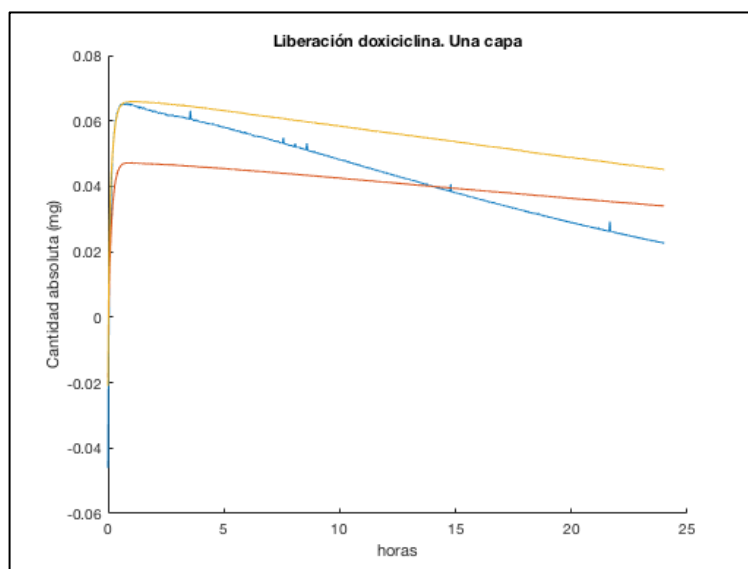
max7=max(c7);
pos7=find(c7==max7);
tmax7=time(pos7)
max8=max(c8);
pos8=find(c8==max8);
tmax8=time(pos8)
max9=max(c9);
pos9=find(c9==max9);
tmax9=time(pos9)
tmedio_3c=(tmax7+tmax8+tmax9)/3 %tiempo medio para tres capas
end

```

## RESULTADOS OBTENIDOS







## A2. Estudio en Matlab de la liberación del Carvacrol

```
function [newpza1, newpza2, newpza3, newpza4, newpza5, newpza6, newpza7,
newpza8, newpza9, tmedio_1c, tmedio_2c, tmedio_3c ] = estudicvc( pza10,
pza20, pza30, pza40, pza50, pza60, pza70, pza80, pza90, time)
%UNTITLED5 Summary of this function goes here
% Detailed explanation goes here
[time]=time;

[y]=0.8387*exp(-0.4515*time)+0.1518;

[pza1]=pza10;
[pza2]=pza20;
[pza3]=pza30;
[pza4]=pza40;
[pza5]=pza50;
[pza6]=pza60;
[pza7]=pza70;
[pza8]=pza80;
[pza9]=pza90;

[newpza1]=pza1+1.7-y1;
[newpza2]=pza2+(1-y);
[newpza3]=pza3+(1-y);
[newpza4]=pza4+(1-y);
[newpza5]=pza5+(1-y);
[newpza6]=pza6+(1-y);
[newpza7]=pza7+(1-y);
[newpza8]=pza8+(1-y);
[newpza9]=pza9+(1-y);

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Una capa')
xlabel('horas')
ylabel('Abs')
plot(time, newpza1)
plot(time, newpza2)
plot(time, newpza3)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Dos capas')
xlabel('horas')
```

```
ylabel('Abs')
plot(time, newpza4)
plot(time, newpza5)
plot(time, newpza6)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Tres capas')
xlabel('horas')
ylabel('Abs')
plot(time, newpza7)
plot(time, newpza8)
plot(time, newpza9)
hold off

%Recta de calibración
[c1]=(newpza1-0.0061)/0.0286;
[c2]=(newpza2-0.0061)/0.0286;
[c3]=(newpza3-0.0061)/0.0286;
[c4]=(newpza4-0.0061)/0.0286;
[c5]=(newpza5-0.0061)/0.0286;
[c6]=(newpza6-0.0061)/0.0286;
[c7]=(newpza7-0.0061)/0.0286;
[c8]=(newpza8-0.0061)/0.0286;
[c9]=(newpza9-0.0061)/0.0286;

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Una capa')
xlabel('horas')
ylabel('Concentración (%)')
plot(time, c1)
plot(time, c2)
plot(time, c3)
hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Dos capas')
xlabel('horas')
ylabel('Concentración (%)')
plot(time, c4)
plot(time, c5)
plot(time, c6)
```

```

hold off

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Tres capas')
xlabel('horas')
ylabel('Concentración (%)')
plot(time, c7)
plot(time, c8)
plot(time, c9)
hold off

```

```

%Cantidad absoluta
[q1]=(c1/1.362)/100;
[q2]=(c2/1.432)/100;
[q3]=(c3/1.363)/100;
[q4]=(c4/1.372)/100;
[q5]=(c5/1.361)/100;
[q6]=(c6/1.348)/100;
[q7]=(c7/1.406)/100;
[q8]=(c8/1.354)/100;
[q9]=(c9/1.350)/100;

```

```

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Una capa')
xlabel('horas')
ylabel('Cantidad absoluta (mg)')
plot(time, q1)
plot(time, q2)
plot(time, q3)
hold off

```

```

figure;
hold on
title('Liberación doxiciclina. Dos capas')
xlabel('horas')
ylabel('Cantidad absoluta (mg)')
plot(time, q4)
plot(time, q5)
plot(time, q6)
hold off

```

```

figure;
hold on

```



```
title('Liberación doxiciclina. Tres capas')
xlabel('horas')
ylabel('Cantidad absoluta (mg)')
plot(time, q7)
plot(time, q8)
plot(time, q9)
hold off

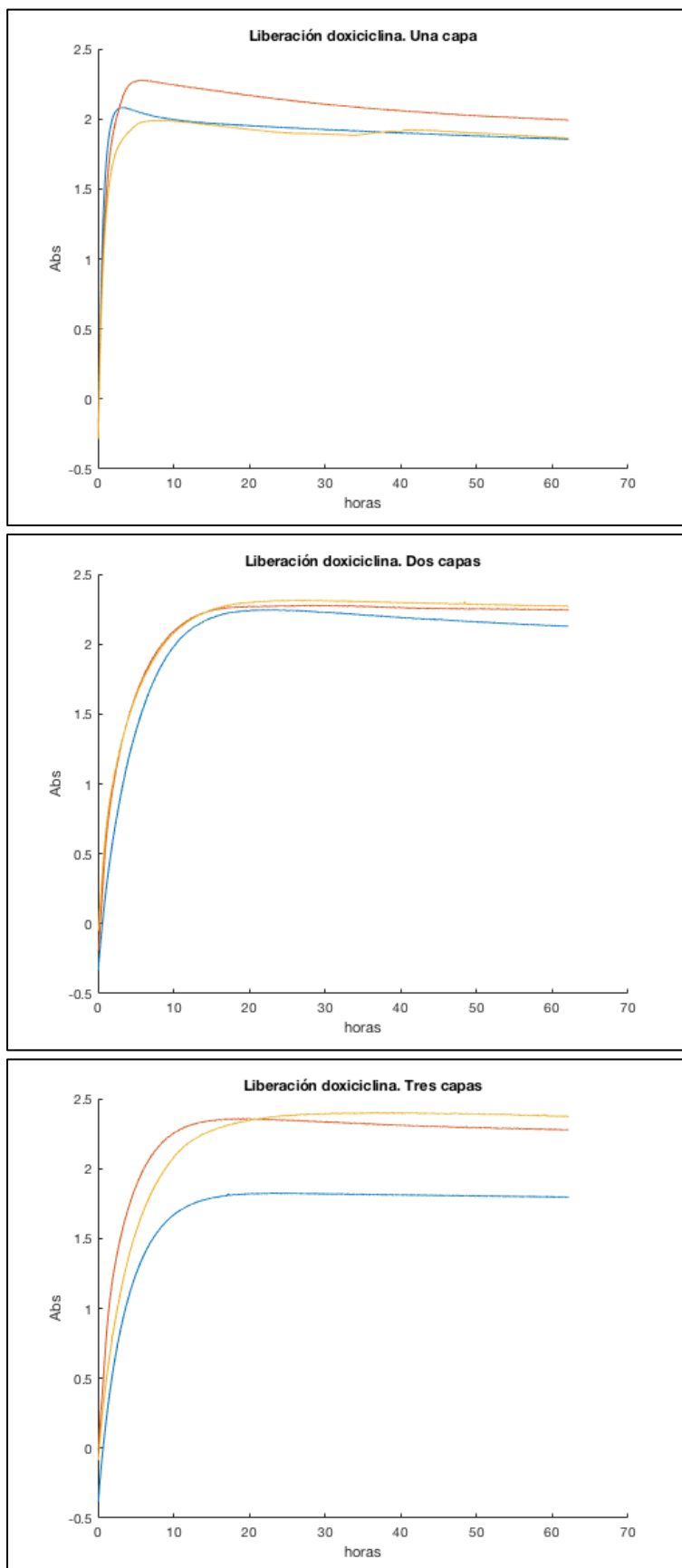
%calcular la constante de retraso
max1=max(c1);
pos1=find(c1==max1);
tmax1=time(pos1);
max2=max(c2);
pos2=find(c2==max2);
tmax2=time(pos2);
max3=max(c3);
pos3=find(c3==max3);
tmax3=time(pos3);
tmedio_1c=(tmax1+tmax2+tmax3)/3 %tiempo medio para una capa

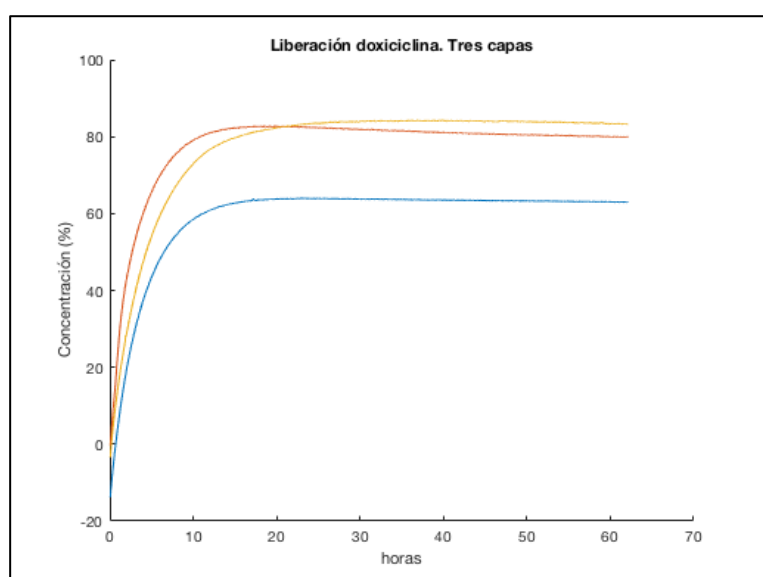
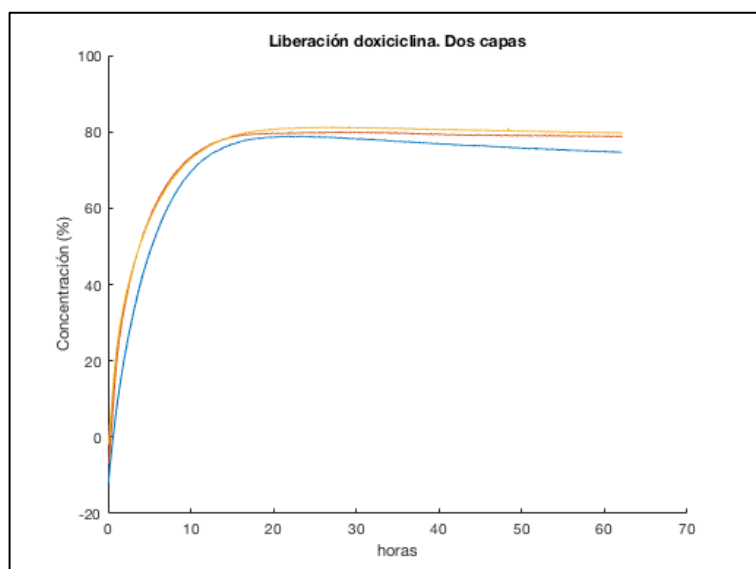
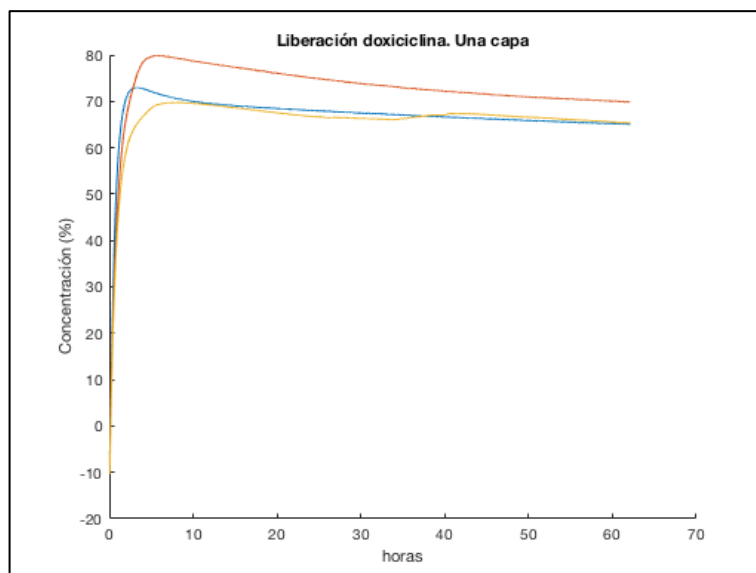
max4=max(c4);
pos4=find(c4==max4);
tmax4=time(pos4);
max5=max(c5);
pos5=find(c5==max5);
tmax5=time(pos5);
max6=max(c6);
pos6=find(c6==max6);
tmax6=time(pos6);
tmedio_2c=(tmax4+tmax5+tmax6)/3 %tiempo medio para dos capas

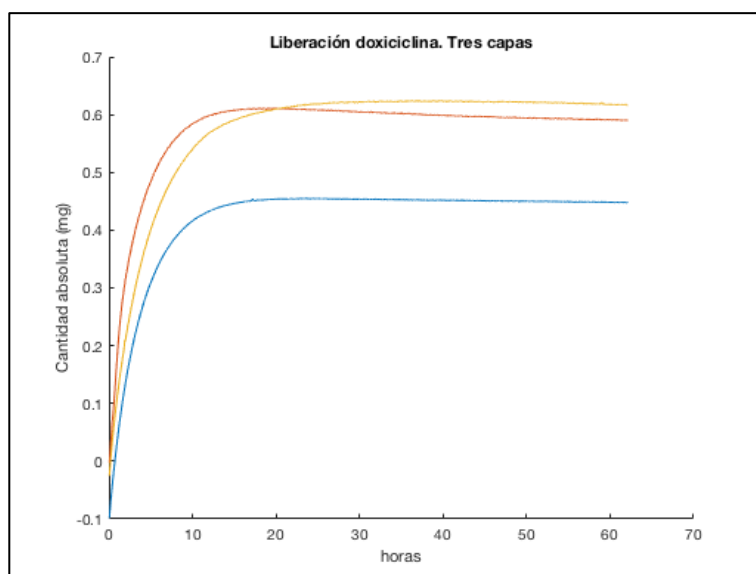
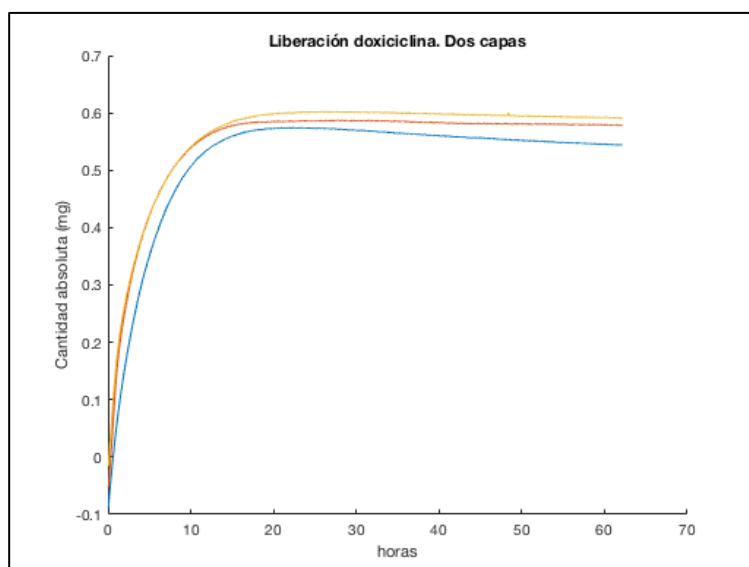
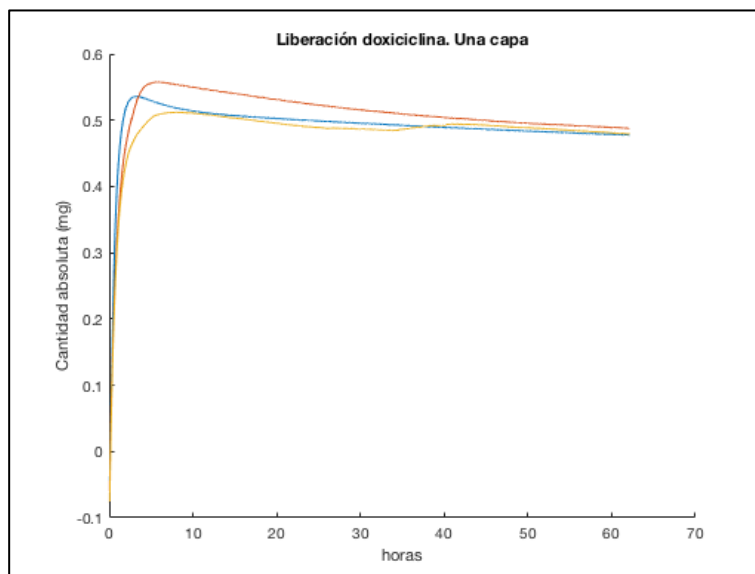
max7=max(c7);
pos7=find(c7==max7);
tmax7=time(pos7);
max8=max(c8);
pos8=find(c8==max8);
tmax8=time(pos8);
max9=max(c9);
pos9=find(c9==max9);
tmax9=time(pos9);
tmedio_3c=(tmax7+tmax8+tmax9)/3 %tiempo medio para tres capas

end
```

RESULTADOS OBTENIDOS:



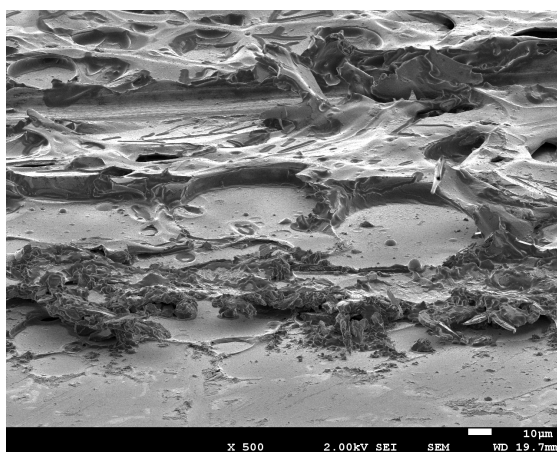
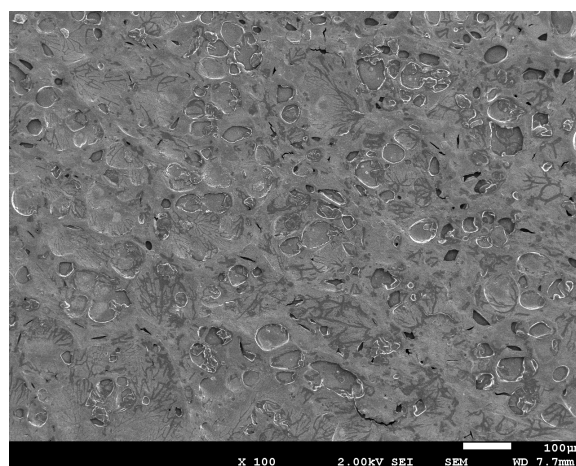
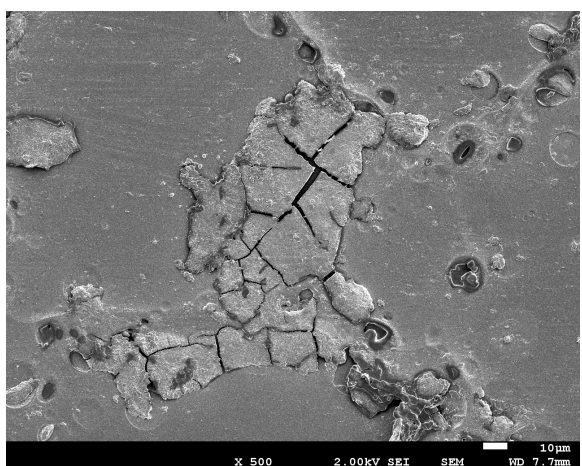
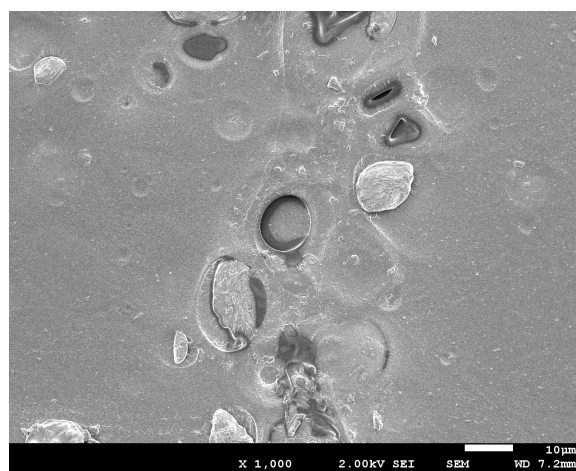
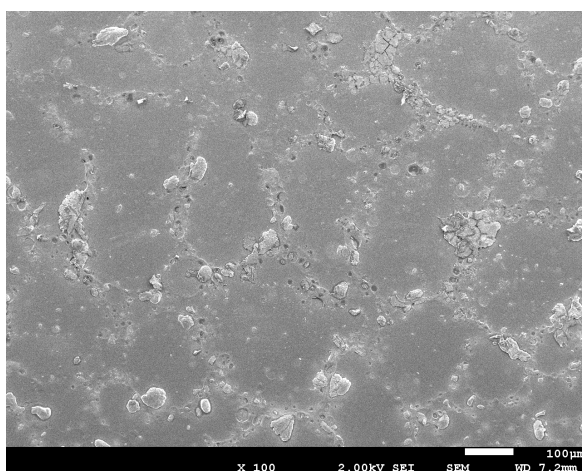




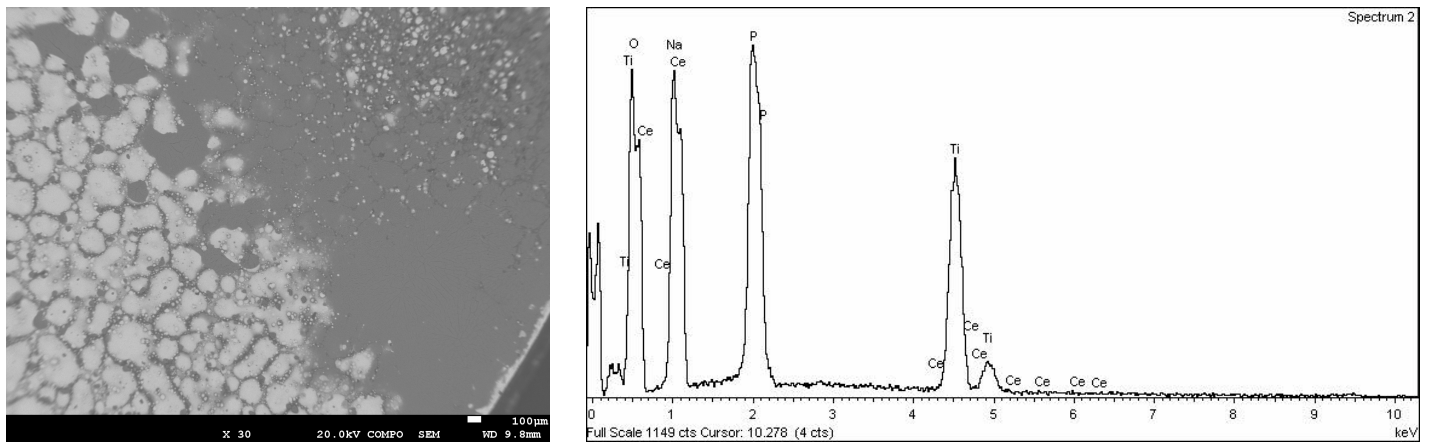
## Apéndice B

### B.1 Imágenes obtenidas con el SEM

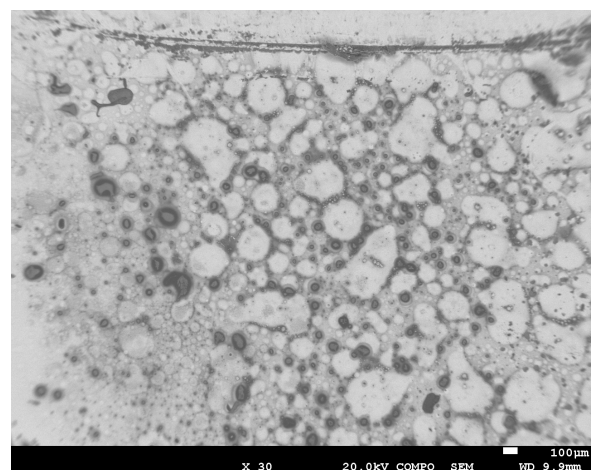
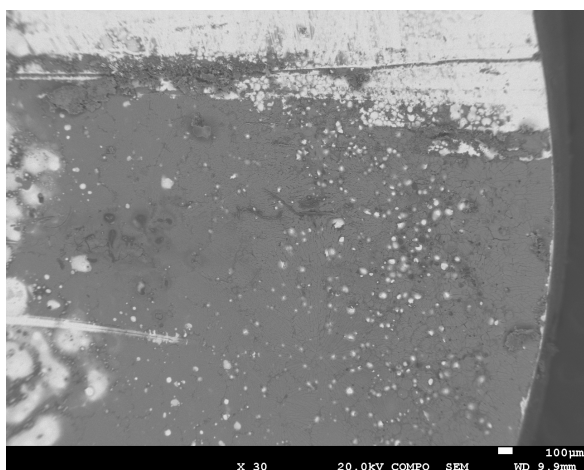
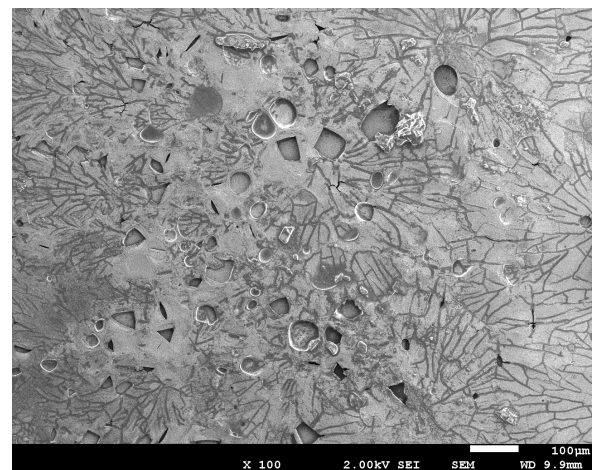
#### 1. Recubrimiento con una capa de quitosano:

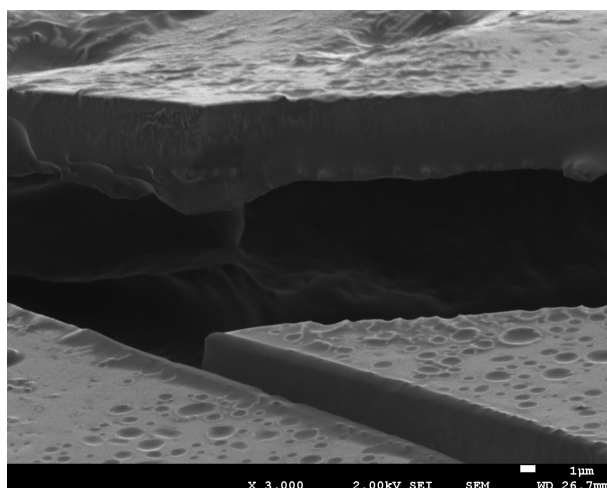
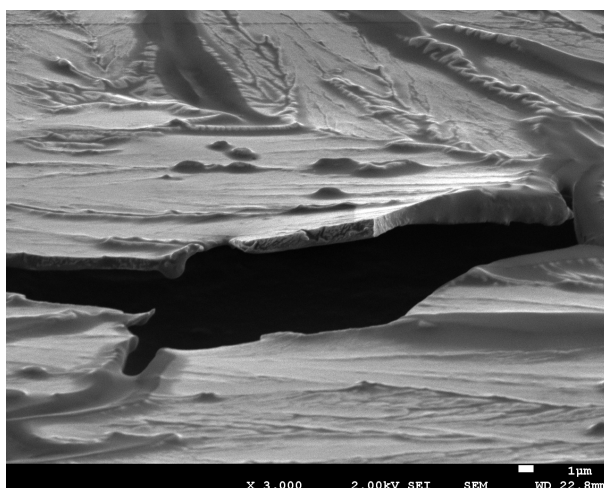




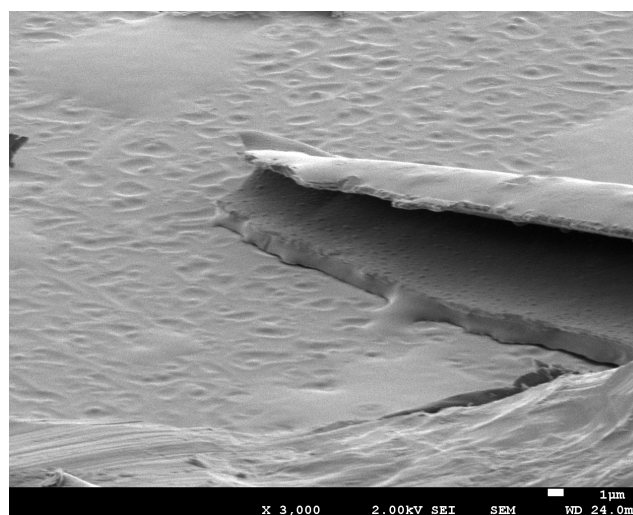
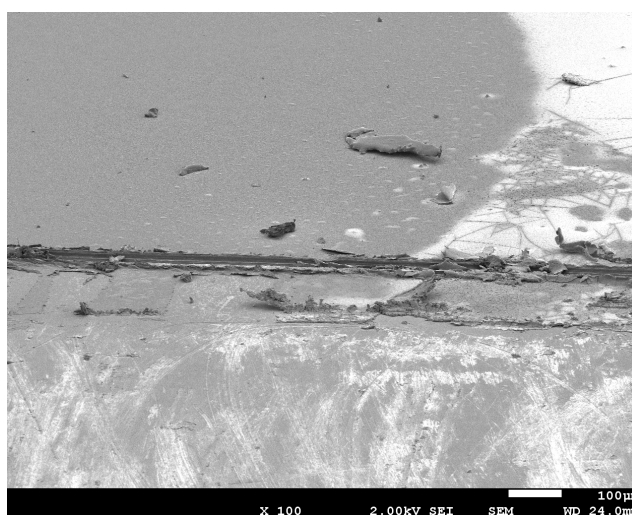
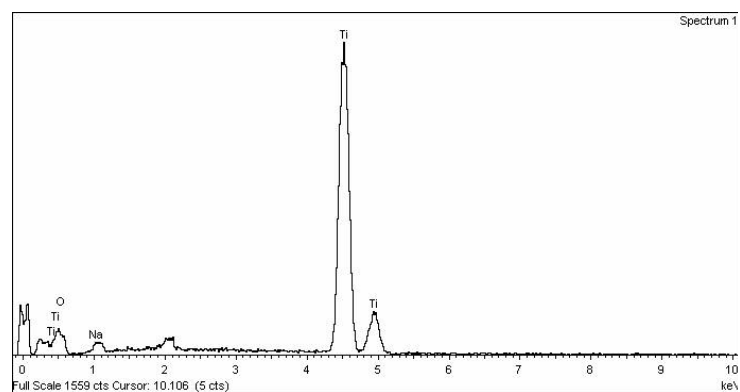
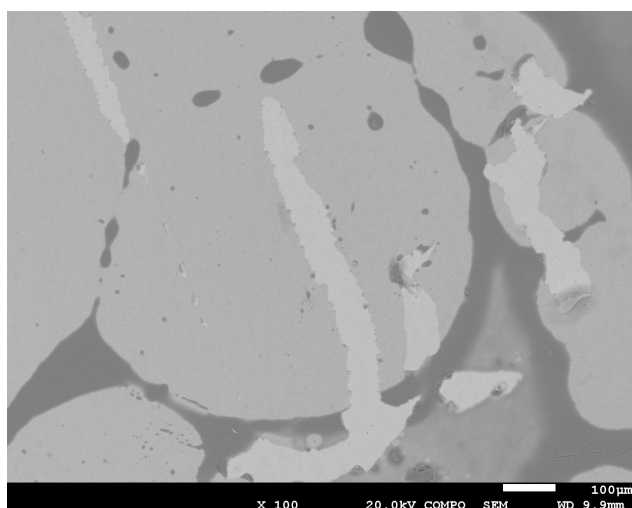


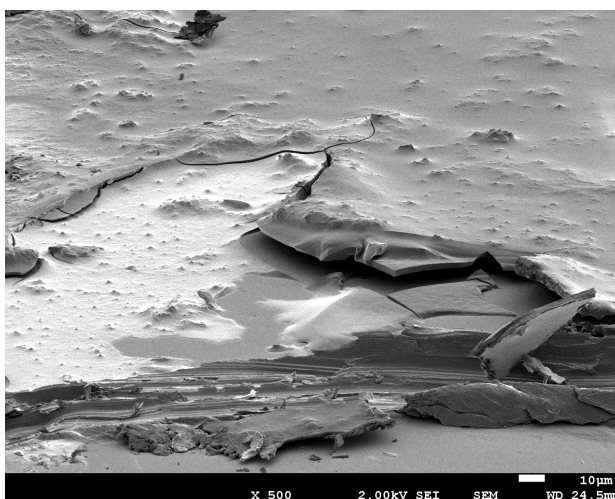
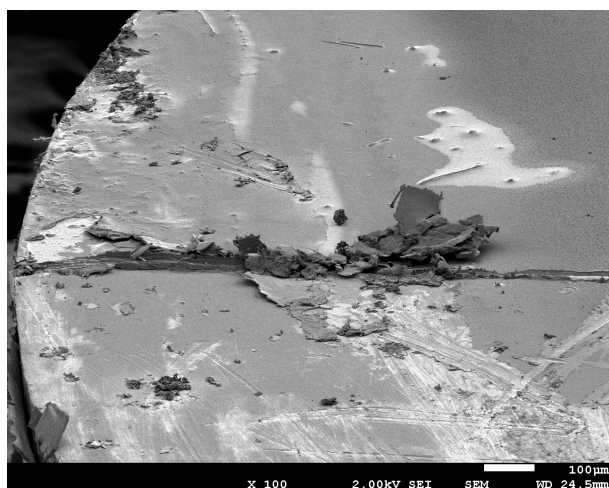
## 2. Recubrimiento con una capa de quitosano + carvacrol:



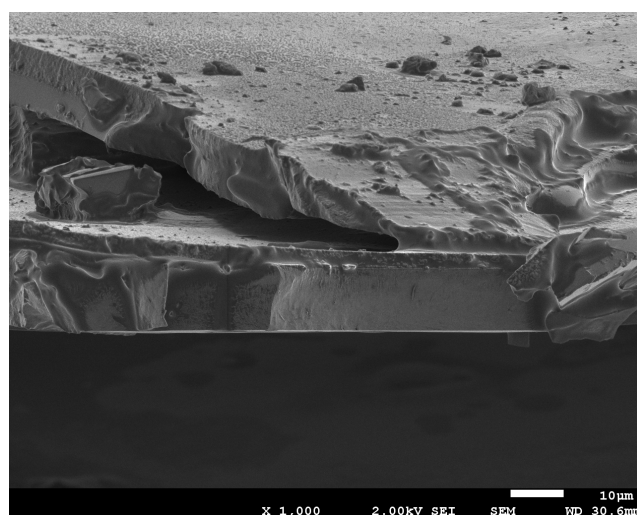
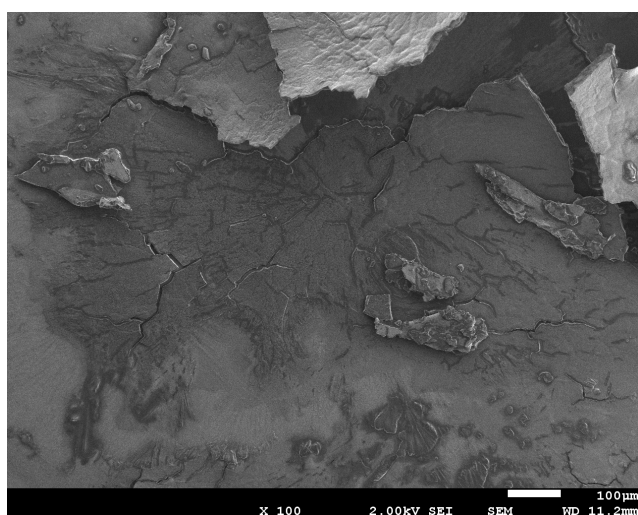
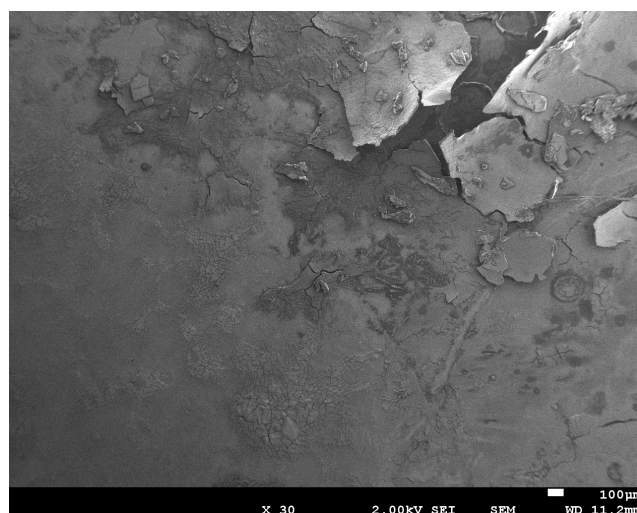
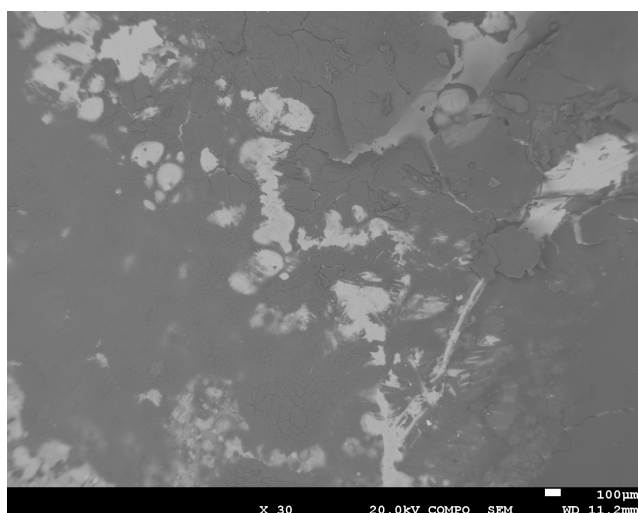


### 3. Recubrimiento con dos capas de quitosano + carvacrol:

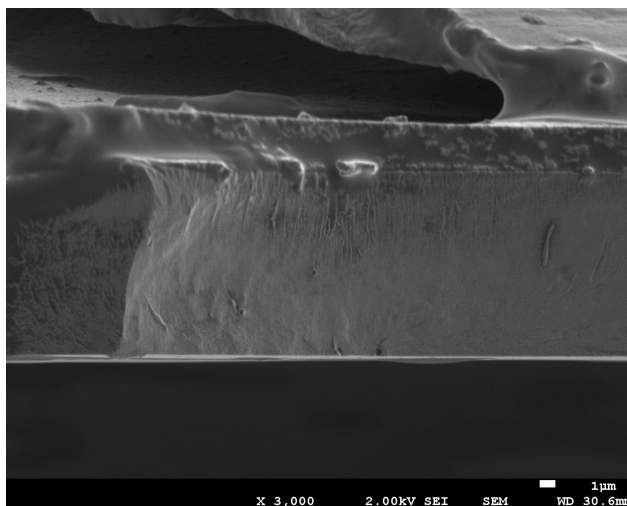




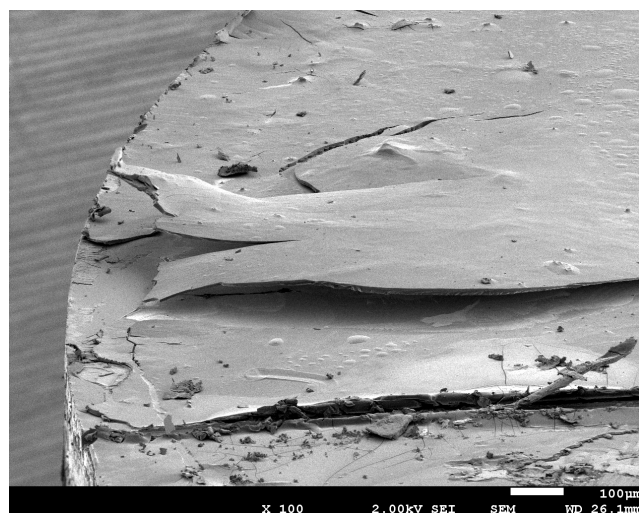
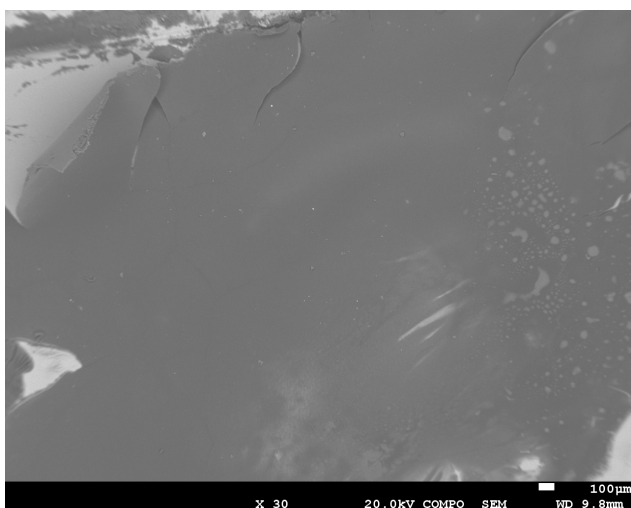
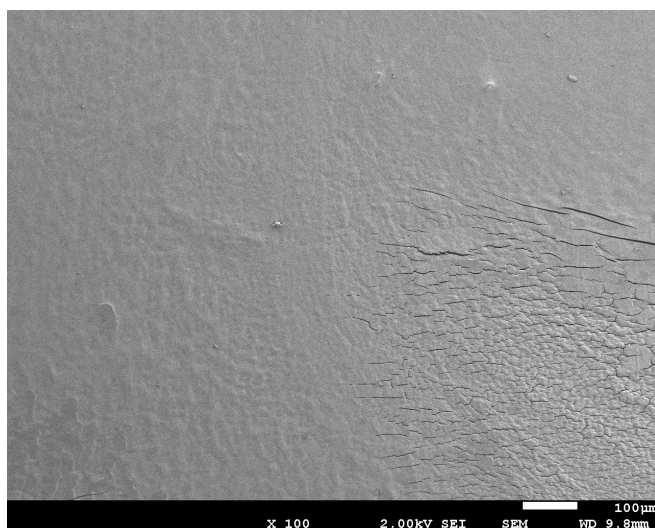
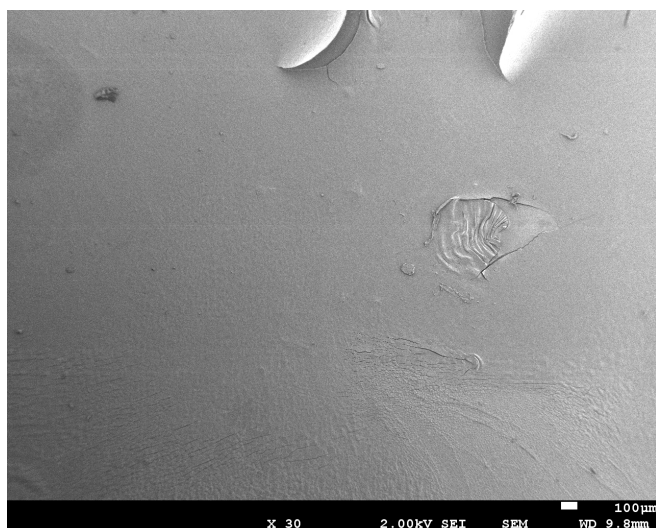
#### 4. Recubrimiento con una capa de quitosano + doxiciclina:

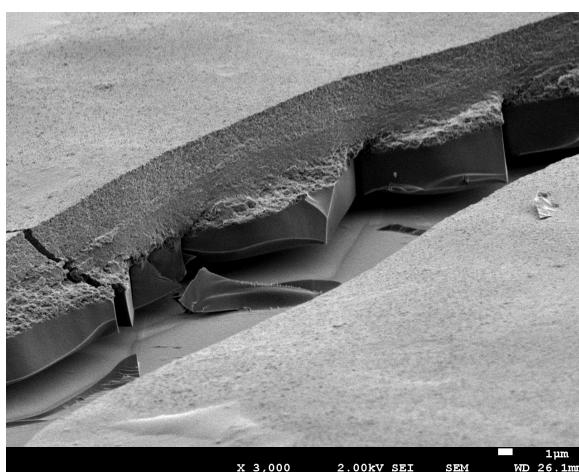
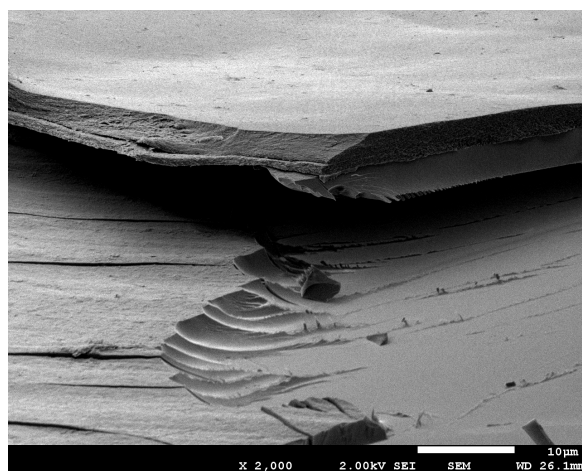
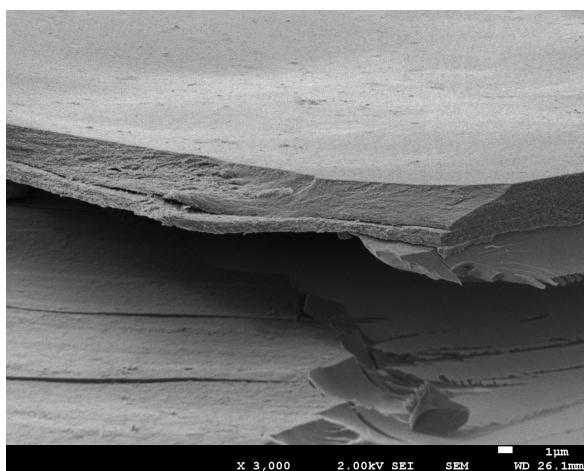






5. Recubrimiento con dos capas de quitosano + doxiciclina:





## Apéndice C

### C.1 Análisis estadístico de variancia para el ensayo bacteriológico

Análisis para DOX de una y dos capas a 24 h:

	DOX 1	DOX 2	
	27,77	28,64	
	32,48	29,49	
	29,3	27,56	
Media	29,85	28,56333333 3	29,20666666 7

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
SCF	8,277555556	4	8,277555556
SCR	13,41706667	1	3,354266667
SCT		5	

F ratio	t	p
2,467769077	-0,51043	0,310415

Como  $p > 0,05$ , NO hay diferencias significativas.

Análisis para DOX de una y dos capas a 48 h:

	DOX 1	DOX 2	
	12,9	15,45	
	15,87	17,29	
	16,2	14,29	
Media	14,99	15,67666667	15,33333333

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
SCF	2,357555556	4	2,357555556
SCR	11,18366667	1	2,795916667
SCT		5	

F ratio	t	p
0,843213814	-0,09688	0,462368

Como  $p > 0,05$ , NO hay diferencias significativas.

#### Analisis para CVR de una y dos capas a 24 h:

	CVR 1	CVR2	
	21,34	18,98	
	24,7	23,88	
	17,14	18,87	
Media	21,06	20,57666667	20,81833333

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
SCF	1,168055556	4	1,168055556
SCR	45,06846667	1	11,26711667
SCT		5	

F ratio	t	p
0,103669429	-0,21742	0.02739

Como  $p < 0,05$ , SÍ se consideran diferencias significativas.

#### Analisis para CVR de una y dos capas a 48 h:

	CVR 1	CVR 2	
	9,89	10,54	
	11,15	12,94	
	9,89	10,67	
Media	10,31	11,38333333	10,84666667

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
SCF	5,760222222	4	5,760222222
SCR	4,701666667	1	1,175416667
SCT		5	

F ratio	t	p
4,900578991	-0,18918	0,426868

Como  $p > 0,05$ , NO hay diferencias significativas.

